



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUTO PARA O ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA TUBERCULOSE BOVINA EM
ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVÁTICOS NA REGIÃO DE PORTALEGRE

ANDRÉ SANTOS SILVA RAPOSO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Manuel d'Almeida Bernardo

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Dra. Maria do Carmo Palma Caetano

ORIENTADOR

Dra. Maria do Carmo Palma Caetano

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

2011

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUTO PARA O ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA TUBERCULOSE BOVINA EM
ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVÁTICOS NA REGIÃO DE PORTALEGRE

ANDRÉ SANTOS SILVA RAPOSO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Manuel d'Almeida Bernardo

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Dra. Maria do Carmo Palma Caetano

ORIENTADOR

Dra. Maria do Carmo Palma Caetano

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

2011

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Esta Dissertação é fruto do trabalho desenvolvido no âmbito do estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Deste modo, gostaria de expressar o meu agradecimento para com aqueles que me apoiaram nesse período e contribuíram para a realização deste trabalho:

À minha família, nomeadamente aos meus pais e irmã, pela valiosa ajuda na revisão destas páginas. Aos meus amigos, em particular os companheiros desta luta que foi escrever a tese, mas também os que me acompanharam nos momentos em que era necessário esquecer que havia um trabalho por acabar.

À Dra. M^a Carmo Caetano e ao Professor Doutor Fernando Boinas, respectivamente meus orientador e co-orientador de estágio, por toda a disponibilidade e paciência, bem como pelo precioso contributo na redacção desta dissertação.

À DGV pela oportunidade de realizar este estágio e a todo o pessoal da DIV Portalegre pela maneira como me recebeu, em especial a Dra. M^a José Correia, a Dra. Fátima Mendes e o Dr. Pedro Almeida pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Dr. Derriça Mendes, Dr. Luís Mendes e Dr. Nuno Santos pela possibilidade de os acompanhar nas montarias e pelos seus ensinamentos nessa área.

Ao Dr. Rui Correia pela colaboração prestada pela AFN.

À Professora Doutora Conceição Peleteiro e ao Dr. Hugo Pissarra do Laboratório de Anatomia Patológica da FMV, pela disponibilidade e auxílio com os exames histopatológicos das amostras por mim recolhidas.

Ao Dr. Telmo Nunes pela ajuda prestada na área dos Sistemas de Informação Geográfica.

RESUMO

Contributo para o estudo epidemiológico da tuberculose bovina em animais domésticos e silváticos na região de Portalegre

A tuberculose bovina é uma doença infecciosa que atinge espécies domésticas, silváticas e o Homem, constituindo um problema para as entidades sanitárias veterinárias, devido ao seu potencial zoonótico, ao impacto económico e ao entrave causado à movimentação de animais e produtos. Portugal encontra-se numa fase de pré-erradicação da doença, tendo os esforços com vista a esse objectivo elevados custos para o Estado e para os produtores. Durante o estágio realizou-se um estudo retrospectivo de casos de tuberculose em bovinos entre 2005 e 2009 e fez-se uma pesquisa de lesões desta doença em espécies de caça grossa, ambos na região de Portalegre. Averiguou-se a hipótese de transmissão da doença por animais silváticos em 35 focos de tuberculose bovina, concluindo-se que pode ter havido contactos entre javalis e bovinos domésticos em todos. Os veados, embora tenham uma distribuição mais limitada, coabitam com os bovinos em cerca de 45% das explorações em análise. Também se acompanhou uma montaria, identificando-se lesões macroscópicas compatíveis com tuberculose em 33,3% dos veados e 11,8% dos javalis abatidos, confirmando-se posteriormente em todos os casos a existência de infecção (através de exames histopatológicos e do isolamento de *M. bovis*). Tendo em conta que os resultados obtidos confirmam a existência de tuberculose em veados e javalis de vida livre e o seu contacto com bovinos domésticos em certas regiões, a transmissão da doença entre as diferentes espécies é uma possibilidade.

É necessário esclarecer o papel das espécies silváticas como hospedeiros reservatório ou acidentais de tuberculose, de modo a melhorar a gestão da fauna silvática e dos recursos cinegéticos. Recomenda-se a vigilância sanitária continuada dessas espécies, integrando as boas práticas sanitárias e o acompanhamento médico-veterinário nos procedimentos de inspecção às peças de caça. Devem, ainda, ser implementadas medidas preventivas como a existência de planos de gestão cinegética que contemplem o controlo do tamanho das populações e um maior confinamento dos bovinos em áreas de risco.

A tuberculose bovina é um problema emergente no nosso país, devendo as autoridades competentes, os médicos veterinários, os produtores e os caçadores unir esforços na luta para a erradicação da doença, sem esquecer o risco de as espécies silváticas estarem envolvidas na sua transmissão.

Palavras-chave: Tuberculose bovina, Portalegre, animais domésticos e silváticos.

ABSTRACT

Contribution to the epidemiological study of bovine tuberculosis in domestic animals and wildlife in Portalegre

Bovine tuberculosis is an infectious disease that affects domestic animals, wildlife and Humans, and it remains a problem for veterinary health authorities due to its zoonotic potential, economic impact and obstacles to animal and products movements. Portugal hasn't achieved eradication yet, and the efforts towards that aim have high costs to the country and the farmers.

During the traineeship it was performed a retrospective study on tuberculosis in cattle between 2005 and 2009 and also a survey for this infection in big game, both in the Portalegre region. The risk of bovine tuberculosis transmission from wildlife to cattle was studied in 35 outbreaks and in all of them contacts between wild boars and cattle where possible. Although deers have a more limited distribution, they cohabit with cattle in about 45% of the farms considered. A hunting journey was also accompanied, leading to the identification of gross tuberculosis lesions in 33,3% of the red deers and 11,8% of the wild boars killed. *M. bovis* infection was confirmed through bacteriological exams and histopathology was also positive. These results confirm the existence of tuberculosis in free range red deer and wild boar and its coexistence with cattle in some areas, enabling the transmission of this disease between domestic animals and wildlife.

It is essential to clarify the role of wildlife either as spill-over or reservoir hosts for tuberculosis, in order to achieve a better management of wildlife and game resources. It is recommended a surveillance system for big game, integrating good health practices and veterinary supervision during game meat inspection schemes. Preventive measures such as the creation of game management plans to control population size and a higher confinement of cattle in risk areas should also be implemented.

Bovine tuberculosis is an emerging problem in Portugal, and the competent authorities, veterinarians, farmers and hunters have to join efforts and continue the struggle to eradicate this disease, keeping in mind the risk of its transmission by wildlife.

Keywords: Bovine tuberculosis, Portalegre, domestic animals, wildlife.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice.....	vii
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas.....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
1. Introdução.....	1
2. Breve caracterização do estágio curricular.....	2
3. Revisão bibliográfica.....	6
3.1. Género <i>Mycobacterium</i>	6
3.1.1. Características gerais e classificação	6
3.1.2. Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
3.1.2.1. Filogenia do MTC	9
3.1.2.2. Detecção e identificação dos membros do MTC	11
3.1.2.3. Genotipagem dos membros do MTC	12
3.2. Tuberculose bovina	15
3.2.1. Vias de infecção e transmissão.....	16
3.2.2. Patogenia e resposta imunitária.....	17
3.2.3. Situação epidemiológica	18
3.2.4. Programas de erradicação.....	21
3.2.5. Diagnóstico	23
3.2.5.1. Diagnóstico <i>in vivo</i>	23
3.2.5.2. Diagnóstico <i>post mortem</i>	26
3.3. Tuberculose em espécies silváticas	27
3.3.1. Epidemiologia dos reservatórios naturais da doença	27
3.3.1.1. Situação na Península Ibérica	29
3.3.2. Medidas de controlo.....	31
3.3.3. Inspeção sanitária de peças de caça maior.....	31
3.4. Implicações na saúde pública.....	32
4. Objectivos	34
5. Actividade I - Focos de tuberculose na DIV Portalegre	35
5.1. Caracterização da área em estudo.....	35
5.2. Materiais e métodos	36
5.2.1. Recolha de dados	36
5.2.2. Processamento dos dados.....	37
5.3. Resultados	37
5.3.1. Caracterização das explorações em estudo.....	40

5.3.2. Caracterização dos focos de tuberculose.....	41
5.3.3. Origem da doença nas explorações / Possibilidade de contactos entre animais domésticos e silváticos	42
5.4. Discussão.....	44
6. Actividade II - Acompanhamento de uma montaria	49
6.1. Caracterização da zona de caça	49
6.2. Materiais e métodos	51
6.2.1. Inspeção macroscópica.....	51
6.2.2. Recolha de amostras	52
6.2.3. Processamento das amostras.....	53
6.3. Resultados	53
6.3.1. Inspeção macroscópica e recolha de amostras.....	53
6.3.2. Testes de diagnóstico	55
6.3.2.1. Bacteriologia.....	55
6.3.2.2. Histopatologia.....	55
6.4. Discussão.....	56
7. Conclusões	60
8. Bibliografia	62
Anexos.....	71
Anexo 1	73
Anexo 2.....	75
Anexo 3.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Zona de intervenção da DIV Portalegre.	2
Figura 2 – Percentagem de visitas/vistorias a explorações pecuárias ou estabelecimentos por plano.	4
Figura 3 – Evolução filogenética do MTC baseada nas eliminações sucessivas de regiões de diferença (RD) e polimorfismos em determinados genes.....	10
Figura 4 – Representação esquemática do <i>locus</i> DR no genoma micobacteriano.....	13
Figura 5 – Exemplo de perfil de spoligotyping e respectivo código binário.	14
Figura 6 – Comparação de um isolado de <i>M. bovis</i> com outras estirpes da base de dados online MIRU-VNTRplus, baseado no perfil MIRU-VNTR para 24 <i>loci</i>	15
Figura 7 – Classificação actual dos países da União Europeia, Noruega e Suíça relativamente à tuberculose bovina.....	20
Figura 8 – Tuberculose bovina: prevalência em explorações e prevalência animal em Portugal de 2000 a 2009.....	21
Figura 9 – Partilha de diferentes padrões de spoligotyping de <i>M. bovis</i> e <i>M. caprae</i> entre hospedeiros domésticos e silváticos.	30
Figura 10 – Distribuição do efectivo bovino reprodutor por concelho e média de animais por exploração.	35
Figura 11 – Prevalência de tuberculose bovina em explorações entre 2005 e 2009. Comparação entre os valores nacionais (PT), da DSVR do Alentejo e da DIV Portalegre.	36
Figura 12 – Localização dos focos activos de tuberculose bovina na DIV Portalegre, entre 2005 e 2009.....	39
Figura 13 – Distribuição dos focos activos de tuberculose bovina por concelho.	40
Figura 14 – Distribuição das explorações em estudo por dimensão do efectivo.....	41
Figura 15 – Distribuição dos animais suspeitos de tuberculose bovina por concelho.	42
Figura 16 – Exemplos de vedação utilizada para delimitar as explorações pecuárias.....	44
Figura 17 – Localização geográfica do pavilhão de caça da exploração cinegética da ZCT 1.....	49
Figura 18 – Aspecto típico de um coutado alentejano.....	50
Figura 19 – Animais abatidos e procedimentos anteriores à inspecção e recolha de amostras.....	51
Figura 20 – Inspeção macroscópica de um veado.	52
Figura 21 – Pulmão de veado com lesões granulomatosas cáseo-purulenta de diferentes dimensões.	54
Figura 22 – Linfonodo submandibular de javali com linfadenite purulenta.....	54
Figura 23 – Microfotografias de pulmão de veado.....	56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos focos activos de tuberculose bovina na DIV Portalegre, entre 2005 e 2009.....	38
Tabela 2 – Modo de detecção e confirmação dos novos focos de tuberculose, entre 2005 e 2009.....	41
Tabela 3 – Explorações inseridas em zonas de caça grossa e espécies silváticas existentes.....	43
Tabela 4 – Resultado das épocas venatórias compreendidas entre 04/05 e 08/09 em quatro zonas de caça, para espécies de caça maior.....	50
Tabela 5 – Animais rejeitados devido à existência de lesões compatíveis com tuberculose.	53
Tabela 6 – Resultados dos exames laboratoriais de diagnóstico.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AFN – Autoridade Florestal Nacional
BAAR – Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
BCG – Bacilo de Calmette-Guérin
DGV – Direcção Geral de Veterinária
DIV – Divisão de Intervenção Veterinária
DR – Direct Repeat
DSVR – Direcção de Serviços Veterinários Regional
DVR – Direct Variant Repeat
IDTC – Intradermotuberculinização de comparação
IE – Inquérito Epidemiológico
IFN- γ – Interferão gama
LNIV – Laboratório Nacional de Investigação Veterinária
M. – Género *Mycobacterium*
MAC – Complexo *Mycobacterium avium*
MIRU – Mycobacterial Interspersed Repetitive Units
MTC – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal (antigo Office International des Epizooties)
OPP – Organização de Produtores Pecuários
PE – Programa de Erradicação da Tuberculose Bovina
PISA – Programa Informático de Saúde Animal
RD – Regions of Difference
rDNA – Ácido Desoxirribonucleico ribossomal
rRNA – Ácido Ribonucleico ribossomal
SB – Spoligotype Bovis
SNIRA – Sistema Nacional de Identificação e Registo Animal
VNTR – Variable Number Tandem Repeats

**“SE EU NÃO MORRESSE, NUNCA! E ETERNAMENTE
BUSCASSE E CONSEGUISSE A PERFEIÇÃO DAS COISAS!”**

CESÁRIO VERDE

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma doença infecciosa que apresenta uma evolução geralmente crónica, com o desenvolvimento de lesões granulomatosas típicas. Atinge principalmente os bovinos mas também afecta muitas outras espécies domésticas, silváticas e o Homem.

Em medicina veterinária constitui um problema grave para as entidades sanitárias, não só devido ao seu potencial zoonótico, mas também pelo seu impacto económico e entrave causado à movimentação de animais e produtos. A erradicação desta doença ainda não foi conseguida em Portugal, tendo os esforços com vista a esse objectivo elevados custos para o país, nomeadamente com a testagem periódica dos efectivos, abate sanitário dos animais positivos ou da totalidade do efectivo e respectivas indemnizações aos produtores. Apesar destas últimas, também os produtores sofrem avultados prejuízos económicos resultantes do sequestro das suas explorações.

Devido aos programas de testagem e eliminação dos animais positivos implementados de forma sistemática a partir do final dos anos 80, Portugal encontra-se numa fase de pré-erradicação da tuberculose bovina. No entanto, existem determinadas regiões do nosso país que apresentam valores de prevalência da doença elevados, constituindo zonas de maior dificuldade na sua erradicação. Neste contexto, a presente dissertação procura contribuir para um maior conhecimento da epidemiologia da tuberculose bovina, nomeadamente na interacção entre espécies domésticas e silváticas e a possibilidade de transmissão da infecção entre si, na região de Portalegre.

A zona de Portalegre tem apresentado valores de prevalência da doença maiores que a média nacional, tendo existido alguns casos em que se suspeita da entrada do agente infeccioso na exploração através do contacto directo ou indirecto com animais de vida livre, como veados e javalis. Esta dissertação compreende uma parte inicial, a revisão bibliográfica, em que é feito um resumo da literatura acerca da tuberculose. Não se pretendeu fazer uma descrição exaustiva sobre a doença, mas sim focar abreviadamente os seus aspectos principais, de forma a enquadrar o trabalho prático desenvolvido. Este último foi dividido em duas partes, baseando-se a primeira num estudo retrospectivo de casos de tuberculose em bovinos e o segundo na pesquisa desta doença em espécies de caça grossa (veados e javalis).

2. BREVE CARACTERIZAÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR

O meu estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária decorreu durante oito meses e foi repartido em duas etapas que me permitiram observar de perto diferentes realidades no âmbito da Medicina Veterinária.

Num primeiro período de estágio, compreendido entre os meses de Outubro de 2009 e Fevereiro de 2010, estagiei na Direcção de Serviços Veterinários da Região do Alentejo (DSVR do Alentejo), acompanhando a actividade da Divisão de Intervenção Veterinária de Portalegre (DIV Portalegre) no seu trabalho de defesa da saúde e do bem-estar animal e de salvaguarda da saúde pública. Durante este período tive oportunidade de fazer a pesquisa posteriormente utilizada nesta tese, ao recolher os dados dos focos de tuberculose bovina nos últimos cinco anos na área de intervenção da DIV Portalegre (concelhos de Alter do Chão, Avis, Castelo de Vide, Crato, Gavião, Marvão, Nisa, Ponte de Sôr e Portalegre) (Figura 1).

Figura 1 - Zona de intervenção da DIV Portalegre.



Este estágio permitiu-me seguir de perto as acções do Programa de Erradicação da Tuberculose Bovina, desde a recepção dos resultados das provas de rastreio das explorações, dos comunicados de doença de declaração obrigatória por parte dos estabelecimentos de abate e das provas laboratoriais até à sua validação no Programa Informático de Saúde Animal (PISA.net) e as consequentes medidas de profilaxia e polícia sanitária. Estas últimas incluem redigir o auto de notificação do proprietário, decretar o isolamento dos animais suspeitos e a proibição da movimentação animal, acompanhar o posterior abate sanitário e realizar um inquérito epidemiológico para determinar a origem do

foco e quais os factores de risco de transmissão da infecção no efectivo e nas explorações epidemiologicamente conectadas.

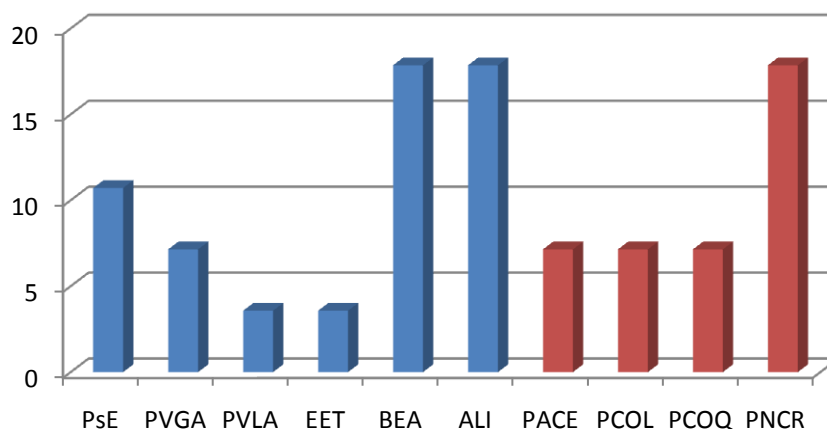
Além das actividades relacionadas directamente com o tema deste trabalho, estive envolvido nos mesmos procedimentos descritos anteriormente para os Programas de Erradicação da Brucelose e Leucose Bovina e Brucelose dos Pequenos Ruminantes. Ainda no âmbito da saúde e protecção animal, acompanhei as actividades dos seguintes planos/programas:

- Programa de Vigilância de Gripe Aviária em Aves Domésticas e Aves Selvagens (PVGA) - realização de zaragatoas da cloaca em explorações de perdiz vermelha (*Alectoris rufa*);
- Plano de Controlo e Vigilância da Língua Azul (PVLA) - montagem e recolha de armadilhas para captura de culicídeos;
- Plano de Controlo e Vigilância das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis - controlo e identificação do efectivo de uma exploração de ovinos referenciada por tremor epizoótico;
- Plano de Controlo do Bem-Estar Animal - controlo das condições das instalações para animais em explorações pecuárias;
- Plano de Controlo Oficial da Alimentação Animal - recolha de amostras de alimentos compostos para animais em explorações.

Também segui várias acções de controlo no campo da higiene pública veterinária nomeadamente as seguintes:

- Plano para Aprovação e Controlo de Estabelecimentos (PACE) - vistoria a estabelecimentos de transformação de produtos de origem animal, como salsicharias;
- Plano de Controlo Oficial para o Leite Cru (PCOL) - vistoria a salas de ordenha e armazenamento de leite;
- Plano de Controlo Oficial para as Queijarias (PCOQ) - vistoria a queijarias tradicionais e industriais;
- Plano Nacional de Controlo de Resíduos (PNCR) - recolha de amostras de urina para pesquisa de resíduos de medicamentos e de contaminantes ambientais (Figura 2).

Figura 2 - Percentagem de visitas/vistorias a explorações pecuárias ou estabelecimentos por plano.



Legenda: A azul os planos no âmbito da saúde e protecção animal (PsE – Programas de Erradicação da Tuberculose, Brucelose e Leucose Bovina e Brucelose dos Pequenos Ruminantes; PVGA – Programa de Vigilância da Gripe Aviária; PVLA – Programa de Vigilância da Língua Azul; EET – Plano de Controlo e Vigilância das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis; BEA – Plano de Controlo do Bem-Estar Animal; ALI – Plano de Controlo Oficial da Alimentação Animal). A vermelho os planos no âmbito da higiene pública veterinária (PACE – Plano para Aprovação e Controlo de Estabelecimentos; PCOL – Plano de Controlo Oficial para o Leite Cru; PCOQ – Plano de Controlo Oficial para as Queijarias; PNCR – Plano Nacional de Controlo de Resíduos).

Durante este período acompanhei ainda os procedimentos de inspecção sanitária de espécies de caça maior, em duas montarias realizadas no Alentejo.

A primeira foi na Zona de Caça Nacional do Perímetro Florestal da Contenda, concelho de Moura, onde acompanhei o corpo de inspecção no exame inicial de cerca de 80 veados e 20 javalis. Aqui aprendi com o médico veterinário responsável os procedimentos básicos de inspecção de exemplares de caça maior.

A outra montaria realizou-se numa Zona de Caça Turística da região de Nisa/Castelo de Vide, onde acompanhei o exame inicial de 20 veados e javalis, com colheita de amostras destes últimos para rastreio das Pestes Suínas Clássica e Africana (no âmbito do Plano de Vigilância destas doenças em javalis), da Doença de Aujeszky e da Triquinelose. Uma vez que esta zona de caça se encontra na área da DIV Portalegre, também procedi à colheita de amostras de animais com lesões compatíveis com tuberculose, cujos resultados se apresentam neste trabalho.

Gostaria ainda de referir a oportunidade que tive de frequentar os Workshops sobre Tuberculose Bovina, Brucelose Bovina e Brucelose dos Pequenos Ruminantes, organizados pela Divisão de Documentação e Formação Especializada (DDFE) da Direcção Geral de Veterinária (DGV).

No segundo período de estágio, entre Março e Junho de 2010, estive na Univerzita Veterinárskeho Lekárstva a Farmácie v Košiciach (Universidade de Medicina Veterinária e Farmácia de Košice - Eslováquia), maioritariamente no Departamento de Ruminantes e Suínos nas instalações da Faculdade ou na Quinta Universitária.

Contactei essencialmente com uma vertente clínica, participando em consultas/tratamentos de vacas de leite e vitelos com diversos tipos de patologia, sendo as mais frequentes as claudicações, as mastites, as metrites, a patologia respiratória e as enterites. Em relação aos suínos, destaco as acções de vacinação e de castração de leitões.

Também aproveitei a oportunidade deste estágio num país estrangeiro para conhecer a sua realidade na área da Segurança Alimentar, nomeadamente com visitas a uma unidade de preparação e transformação de pescado e uma unidade de abate de aves e processamento de carne.

Em termos gerais posso concluir que o meu estágio curricular foi um período enriquecedor e importante na minha formação académica, não apenas pela aquisição de competências e conhecimentos, mas também pelo contacto com diferentes realidades e vertentes da profissão médico-veterinária em Portugal e na Eslováquia.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. GÉNERO *MYCOBACTERIUM*

O género *Mycobacterium* foi proposto nos finais do século XIX para englobar os bacilos da lepra (bacilo de Hansen) e da tuberculose (bacilo de Koch), identificados alguns anos antes (Shinnick & Good, 1994). Esta denominação, com origem no Grego *Mycos* (que significa fungo), deve-se ao facto das micobactérias terem um crescimento que se assemelha ao dos fungos, uma vez que formam uma película à superfície dos meios de cultura líquidos semelhante a um micélio (Skoric et al., 2007). Presentemente estão descritas mais de 120 espécies neste género (Smith, Hewinson, Kremer, Brosch & Gordon, 2009), sendo o único constituinte da família *Mycobacteriaceae*, que por sua vez pertence à ordem *Actinomycetales* e classe *Actinobacteria* do super-reino *Bacteria* (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2010).

3.1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS E CLASSIFICAÇÃO

As micobactérias são aeróbias estritas, imóveis, não esporuladas e têm a forma de bastonete (rectilíneo ou ligeiramente curvo) com as seguintes dimensões: 0,2 a 0,6 × 1,0 a 10,0 micrómetros (Quinn, Carter, Markey & Carter, 2004). Uma característica diferenciadora deste grupo de bactérias é o facto de o seu genoma possuir um elevado conteúdo de guanina e citosina, compreendido entre 61 e 71% (Cole et al., 1998). A sua parede celular, única entre os procariotas, tem uma estrutura complexa e um elevado conteúdo lipídico que inclui ácidos micólicos de 60 a 90 carbonos (Shinnick & Good, 1994), conferindo às micobactérias características hidrofóbicas e resistência à maioria dos desinfetantes, dos antibacterianos e à dessecação (Timoney, Gillespie, Scott & Barlough, 1988).

A natureza da parede celular dos membros do género *Mycobacterium* também influencia as técnicas de coloração utilizadas na sua identificação, pois os ácidos micólicos apenas permitem a retenção de corantes adicionados a temperaturas mornas e não permitem a sua remoção por soluções alcoólicas ou ácidas (Skoric et al., 2007), daí a designação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Assim, embora do ponto de vista citoquímico as micobactérias sejam classificadas como Gram-positivas, a fixação dos corantes usados na técnica de Gram torna-se muito difícil (Biberstein & Hirsh, 2004), utilizando-se preferencialmente a coloração de Ziehl-Neelsen. Nesta técnica, a fucsina (corante de cor magenta) consegue penetrar na bactéria devido à acção do calor e os ácidos micólicos da sua parede impedem a eliminação dos corantes absorvidos, mesmo depois da utilização de uma solução ácido-alcoólica (Timoney et al., 1988; Quinn et al., 2004).

Existem diversas classificações não filogenéticas para as espécies do género *Mycobacterium*, baseadas em critérios como o aspecto morfológico das colónias (rugosas ou lisas), a velocidade de crescimento (rápido - inferior a 7 dias; ou lento - superior a 7 dias, geralmente observado nas espécies patogénicas para o Homem e animais), a temperatura óptima de crescimento, a produção de pigmentos e características ecológicas (Shinnick & Good, 1994).

Deste modo, as micobactérias podem ser agrupadas em parasitas obrigatórios (como o *M. leprae* e o *M. lepraemurium*), parasitas intracelulares facultativos (como o *M. tuberculosis*, o *M. bovis* e o *M. avium*) e saprófitas (a grande maioria das espécies incluindo, por exemplo, o *M. phlei*) (Timoney et al., 1988). Estas últimas, também conhecidas como micobactérias atípicas ou não tuberculosas, são encontradas no solo, na vegetação e na água, podendo ocasionalmente provocar doença (Rogall, Wolters, Flohr & Bottger, 1990; Fakinham, 1996; Katoch, 2004).

As micobactérias não tuberculosas foram agrupadas por Runyon com base em critérios de crescimento das colónias, numa classificação útil do ponto de vista clínico. O Grupo I consiste nas bactérias de crescimento lento e fotocromogéneas (produzem pigmento quando expostas à luz), o Grupo II contém as de crescimento lento e escotocromogéneas (produzem pigmento amarelo-alaranjado independentemente da luz), o Grupo III inclui as de crescimento lento e não cromogéneas e, por fim, o Grupo IV é composto pelas espécies de crescimento rápido com pigmentação variável (Quinn et al., 2004).

Taxonomicamente as espécies de micobactérias foram diferenciadas, até finais da década de 80, com base em critérios fenotípicos, existindo listas de testes bioquímicos e características de crescimento de colónias utilizados na sua classificação. No entanto, estes não são suficientes para a identificação de todas as espécies, tendo havido a necessidade de recorrer à comparação de macro-moléculas, como o rRNA, para inferir relações filogenéticas (Rastogi, Legrand & Sola, 2001).

Existem inúmeras espécies deste género capazes de causar doença no Homem e animais (mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes). Para além do *M. leprae* e do *M. tuberculosis*, que durante séculos foram causas de sofrimento para o Homem, é de referir a emergente importância de outras micobactérias, nomeadamente algumas não tuberculosas, devido ao HIV e outras causas de imunossupressão. Em medicina veterinária estas últimas também ocorrem ocasionalmente de forma oportunista, mas são de destacar, pela sua importância, as espécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), responsáveis pela tuberculose nos mamíferos e as do Complexo *Mycobacterium avium* (MAC), que inclui o agente etiológico da paratuberculose ou doença de Johne e o agente da linfadenite suína.

3.1.2. COMPLEXO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis* é constituído por sete espécies, incluindo variadas estirpes, que provocam lesões de tuberculose no Homem e animais:

- *M. tuberculosis* – é a principal causa de tuberculose humana, mas também foi isolado noutros animais como primatas não humanos, cães, gatos e psitacídeos (Quinn et al., 2004);
- *M. bovis* – é o agente etiológico da tuberculose bovina mas é capaz de infectar variados hospedeiros, incluindo o Homem e inúmeros mamíferos domésticos e silváticos. O bacilo de Calmette-Guérin (BCG) é uma estirpe desta espécie, atenuada laboratorialmente e utilizada como vacina contra a tuberculose em Humanos (Brosch, Pym, Gordon & Cole, 2001);
- *M. caprae* – foi inicialmente descrito em Espanha em cabras com lesões de tuberculose disseminadas. Começou por ser considerado uma subespécie do *M. tuberculosis* e depois do *M. bovis* (Niemann, Richter & Rusch-Gerdes, 2002), mas, devido às diferenças genéticas que apresenta, passou a ser encarado como uma espécie distinta em 2003 (Aranaz, Cousins, Mateos & Domínguez, 2003);
- *M. africanum* – é responsável por tuberculose em Humanos (principalmente na África Equatorial), mas também infecta outros mamíferos. É constituído por 2 subtipos e tem propriedades intermédias entre o *M. tuberculosis* e o *M. bovis* (Aranaz et al., 1999);
- *M. microti* – foi inicialmente descrito em ratos-do-campo (género *Microtus*) e, embora seja uma espécie pouco frequente, provoca tuberculose maioritariamente em roedores (Aranaz et al., 1999);
- *M. pinnipedii* – foi inicialmente descrito em focas e leões marinhos e é isolado principalmente em pinípedes (mamíferos marinhos da super-família *Pinnipedia*), de vida livre ou de parques zoológicos (Cousins et al., 2003);
- *M. canettii* – é responsável por alguns casos de tuberculose em Humanos na região do Corno de África, tendo a particularidade de formar colónias lisas (Fabre et al., 2010). Diverge em termos genéticos de todas as outras espécies, tendo por isso sido apontado como o membro mais próximo da espécie ancestral precursora de todo o MTC (Gutierrez et al., 2005). No entanto, segundo Fabre et al. (2010), os estudos existentes até ao momento não são suficientes para o confirmar.

O número de espécies do MTC tende a aumentar com a identificação de novas diferenças genéticas entre estirpes de espécies já conhecidas. Recentemente foi publicado um estudo que descreve o isolamento e caracterização de uma oitava espécie (Alexander et al., 2010). Trata-se do *M. mungi*, um agente patogénico que foi encontrado numa população de mangustos (género *Mungos*) no Botswana. Tem a particularidade de ter uma progressão extremamente rápida e de causar elevada mortalidade, sendo ainda necessária melhor caracterização desta micobactéria, nomeadamente em aspectos como o espectro de hospedeiros e a dinâmica de transmissão.

Para além destas espécies, existem no MTC duas variantes raras e com diferenças ao nível do genótipo e fenótipo, os chamados *dassie* e *oryx bacilli*, cuja posição no MTC permanece por definir (Goodfellow & Magee, 1998; Huard et al., 2006).

Esta subdivisão do MTC em espécies é baseada na combinação de características epidemiológicas, bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e de crescimento, únicas para cada espécie descrita (Huard et al., 2006). De salientar as importantes diferenças encontradas ao nível da afinidade por determinado hospedeiro, virulência e distribuição geográfica (Mostowy et al., 2005). No entanto, como o MTC é constituído por organismos que apresentam mais de 99,9% de homologia ao nível do DNA e sequências idênticas no gene de 16S rRNA (Brosch et al., 2002; Mostowy et al., 2005), existem autores que defendem que os membros do MTC são ecotipos de uma única espécie, adaptados a diferentes hospedeiros (Smith et al., 2006).

3.1.2.1. FILOGENIA DO MTC

A origem e evolução dos membros do MTC não está totalmente clarificada e não é consensual. Inicialmente pensava-se que a espécie *M. tuberculosis* teria surgido a partir do *M. bovis* por adaptação deste último ao hospedeiro humano. No entanto, dados mais recentes indicam que o *M. bovis* e o *M. tuberculosis* partilham um ancestral comum, sem que nenhum tenha evoluído a partir do outro (Sola, Filliol, Legrand, Makrousov & Rastogi, 2001; Smith et al., 2009).

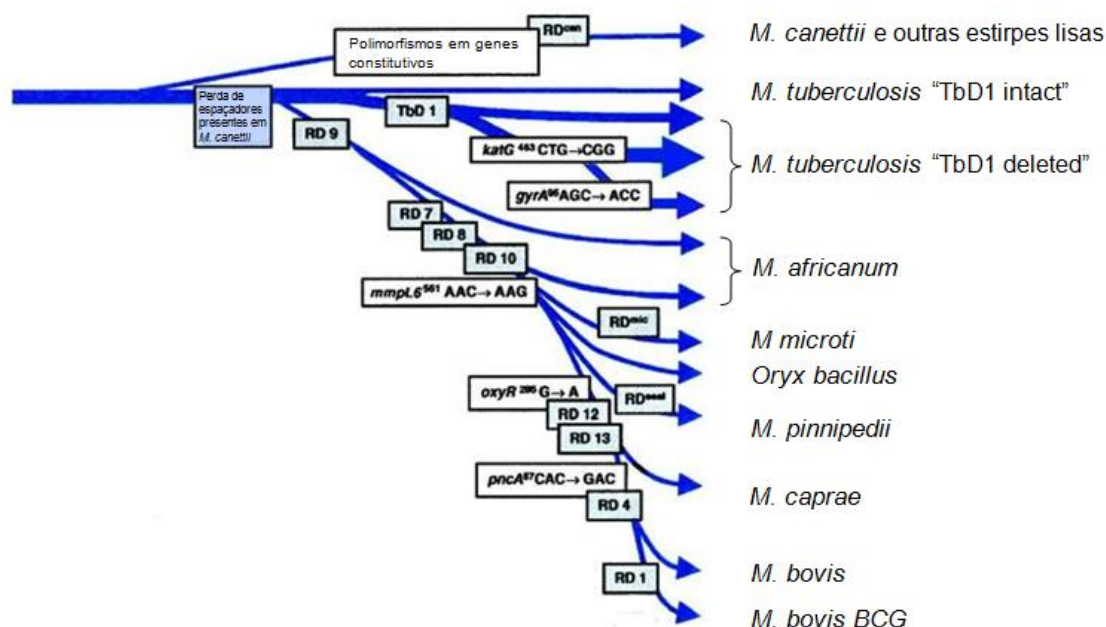
Exceptuando o *M. canettii* e outras estirpes com colónias lisas em que há evidência de transferência horizontal de genes, todos os outros membros do MTC têm uma evolução clonal, evidenciando deleções de sequências nucleotídicas extensas (LSPs – *Large Sequence Polymorphisms*) e eliminações/mutações pontuais numa só base nucleotídica (SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms*), que permitem distinguir diferentes estirpes e inferir relações filogenéticas (Brosch et al., 2002; Mostowy et al., 2005).

Estudos de genómica comparativa entre uma estirpe de *M. tuberculosis* e outra de *M. bovis* identificaram mais de 140 genes cuja presença é facultativa e que estarão relacionados com diferenças ao nível do fenótipo, hospedeiro preferencial e virulência. Muitos desses genes

ocorrem em regiões de diferença (RD – *Regions of Difference*), que são regiões cromossômicas que foram eliminadas em determinadas espécies (Pym, Brodin, Brosch, Huerre & Cole, 2002).

Foi com base no estudo de deleções sucessivas de determinadas RD, que Brosch et al. (2002) traçaram um novo cenário evolutivo para o MTC (Figura 3). Deste modo, o ancestral comum ao *M. bovis* e ao *M. caprae* teria perdido ao longo da evolução as regiões RD9, numa fase seguinte RD7, RD8 e RD10 e por fim RD12 e RD13. É de destacar, ainda, o facto de todas as estirpes vacinais de *M. bovis* BCG partilharem a deleção da RD1 ao contrário do *M. bovis*, sugerindo um papel importante desta região na virulência das estirpes patogénicas do complexo (Mahairas, Sabo, Hickey, Singh & Stover, 1996; Pym et al., 2002). Com a sequenciação do genoma do *M. bovis* (de cerca de 4,35 milhões de pares de bases), confirmou-se que o agente etiológico da tuberculose bovina terá evoluído clonalmente de um progenitor do MTC por fenómenos de eliminação de informação genética que levaram a uma redução no tamanho do seu genoma. Também se concluiu que o *M. bovis* não tem qualquer gene que lhe seja único comparativamente com os outros membros do MTC, sugerindo que expressões genéticas diferenciais sejam a chave para o diferente tropismo em termos de hospedeiro (Garnier et al., 2003).

Figura 3 – Evolução filogenética do MTC baseada nas eliminações sucessivas de regiões de diferença (RD) e polimorfismos em determinados genes. Adaptado de Brosch et al., 2002.



3.1.2.2. DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS MEMBROS DO MTC

A utilização da coloração de Ziehl-Neelsen numa amostra permite observar microscopicamente a presença de BAAR. Também é possível a identificação de micobactérias ao exame microscópico recorrendo a técnicas de fluorescência e à imunoperoxidase. No entanto, é necessário recorrer a outros métodos bacteriológicos e moleculares para tornar possível a sua identificação ao nível da espécie ou da estirpe. Estes procedimentos devem ser realizados em laboratórios de segurança biológica de nível 3 devido ao carácter zoonótico de algumas micobactérias patogénicas.

A) MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS

Para proceder ao isolamento de micobactérias do MTC começa-se por fazer uma descontaminação com uma solução de hidróxido de sódio a 2-4%, de modo a eliminar outros microrganismos que possam interferir no seu crescimento. Seguidamente recorre-se a um meio de cultura como os meios sólidos Lowenstein-Jensen e Stonebrink, ou o meio líquido Middlebrook em conjunto com o sistema radiométrico Bactec, que permite reduzir o tempo de isolamento. A temperatura óptima de crescimento é de 37°C e o período de incubação é de 3 a 8 semanas (Biberstein & Hirsh, 2004; Duarte, 2008).

Os membros do MTC são de crescimento lento e formam colónias não pigmentadas rugosas (excepto o *M. canettii*). É possível distinguir o *M. bovis* do *M. tuberculosis* utilizando meios de cultura específicos e testes bioquímicos que evidenciam as suas características fenotípicas. Assim, sabendo que o crescimento do *M. bovis* é inibido pela hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH) e é potenciado pelo piruvato, pode utilizar-se o meio Lowenstein-Jensen sem TCH ou com piruvato como meio selectivo. Bioquimicamente esta espécie apresenta uma reacção negativa à produção de niacina e à redução de nitratos e é usualmente resistente à pirazinamida (Timoney et al., 1988; Quinn et al., 2004).

Embora o diagnóstico bacteriológico seja algumas vezes inconclusivo, uma vez que é baseado em características fenotípicas que podem ter variações em estirpes da mesma espécie, o isolamento continua a ser o “*gold standard*”.

B) MÉTODOS MOLECULARES

Os métodos moleculares podem ser aplicados de forma complementar aos meios bacteriológicos clássicos em que o isolamento dos membros do MTC é moroso, tendo a vantagem de encurtar o tempo necessário para a sua identificação.

Existem diferentes técnicas moleculares baseadas na análise RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ou mais recentemente em PCR (*Polimerase Chain Reaction*) que permitem o estudo de algumas regiões cromossômicas comuns aos membros do MTC ou próprias de uma espécie ou estirpe (van Soolingen, 2001).

Devido à grande semelhança genética que existe no MTC, é possível a detecção deste grupo de micobactérias analisando o 16S rDNA (o gene de 16S rRNA), a sequência ITS (*Internal Transcribed Spacer*, a região entre os genes de 16S rRNA e 23S rRNA) e a repetição de certos elementos específicos como a sequência de inserção IS6110 ou o *locus* das repetições directas (DR – *Direct Repeat*). No entanto, apenas a análise de polimorfismos nucleotídicos únicos ou de variações no número de cópias destas regiões possibilita a distinção ao nível da espécie ou estirpe (Cousins et al., 1998; Matos, 2009).

Como foi descrito anteriormente (em 3.1.2.1. Filogenia do MTC), as várias regiões de diferença podem ser utilizadas para a diferenciação das espécies dentro do complexo. Existem, ainda, outras regiões genómicas alvo para a sua identificação como o gene *gyrB*, utilizando a técnica *gyrB* PCR-RFLP, que é considerada simples, rápida e sem custos elevados. Deste modo, o *M. bovis* e o *M. caprae* distinguem-se das outras espécies do MTC ao apresentarem uma substituição de guanina por adenosina na posição 756, e diferenciam-se uma da outra através de substituições específicas em determinadas posições (Goh et al., 2006).

A identificação de estirpes, nomeadamente de *M. bovis*, será aprofundada no subcapítulo seguinte (3.1.2.3. Genotipagem dos membros do MTC).

3.1.2.3. GENOTIPAGEM DOS MEMBROS DO MTC

A genotipagem permite caracterizar diferentes estirpes de uma mesma espécie, recorrendo a técnicas de biologia molecular que analisam uma parte ou a totalidade do genoma do microrganismo. Um sistema eficiente de tipificação molecular deverá ter um elevado poder discriminatório, ou seja, permitir a diferenciação clara de um elevado número de estirpes, e possuir elevada reprodutibilidade (Instituto Superior Técnico [IST], 2009).

Para todos os microrganismos a adequação do método de genotipagem utilizado e a escolha da região genómica alvo dependem da natureza do estudo (por exemplo filogenética, microbiológica e epidemiológica) e das características do seu genoma.

No caso da tuberculose bovina, a genotipagem poderá ser muito importante na determinação da origem de um surto, na comparação de isolados de diferentes espécies, na identificação de diferentes estirpes existentes numa mesma zona, bem como em estudos relacionados com virulência e patogenicidade de diferentes estirpes (Skuce & Neill, 2001; DeRiemer & Daley, 2004; Milian-Suazo, et al., 2008).

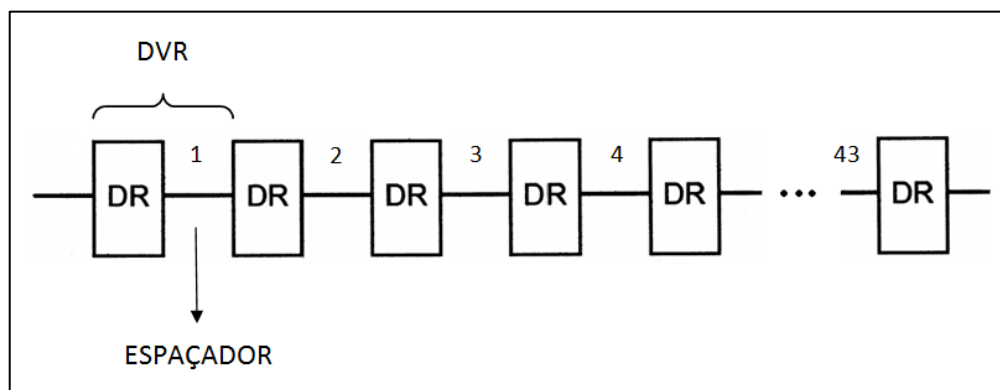
As técnicas de tipificação molecular mais utilizadas actualmente, como o Spoligotyping e o MIRU-VNTR, baseiam-se no método de PCR e recorrem à amplificação de regiões polimórficas específicas, geralmente com sequências nucleotídicas repetidas. Estas têm sido adoptadas na maioria dos laboratórios onde se realiza a tipificação de *M. bovis*, pois são relativamente simples, rápidas e económicas (Romero et al., 2006).

A) SPOLIGOTYPING

O spoligotyping, cujo nome deriva de *Spacer Oligonucleotide Typing*, é aplicável a todos os membros do MTC e é considerada a técnica de eleição numa primeira abordagem em isolados de *M. bovis* (Rodríguez et al., 2010), pois tem um bom grau de diferenciação e reprodutibilidade, embora o poder discriminatório seja menor do que o da técnica MIRU-VNTR (Romero et al., 2006).

Este método é baseado em polimorfismos no *locus* DR, que é constituído por sequências variáveis directas (DVR – *Direct Variant Repeat*). Cada uma das DVRs é formada por uma sequência repetida de 36 pares de bases (DR) e a sequência espaçadora variável adjacente, que tem entre 35 e 41 pares de bases (Aranaz, et al., 1996; Kamerbeek, et al., 1997) (Figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática do *locus* DR no genoma micobacteriano. Adaptado de Kamerbeek et al., 1997.

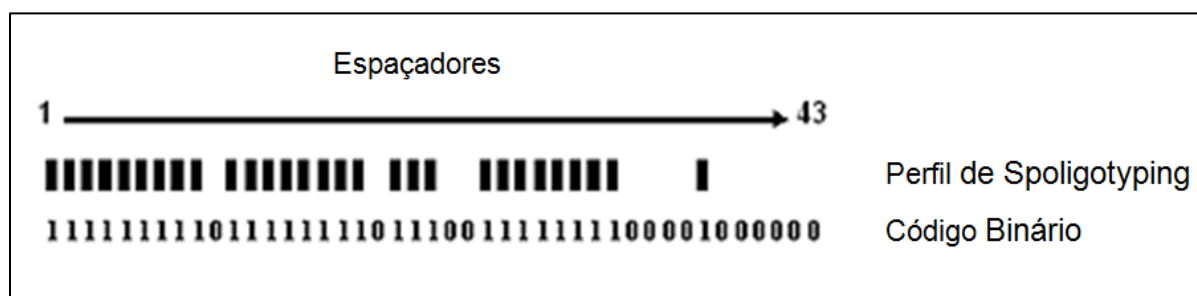


Legenda: DVR – Direct Variant Repeat; DR – Direct Repeat; 1 a 43 – Espaçadores que podem existir em determinada estirpe.

Quando se comparam diferentes estirpes, observa-se que a ordem das várias DVRs é semelhante, sendo o polimorfismo existente resultado da eliminação de uma ou mais dessas DVRs. Assim, as estirpes diferem no número de DRs e na presença ou ausência de determinados espaçadores, num total de 43 possíveis (Zumárraga et al., 1999; Milian-Suazo et al., 2008).

Com base nisto, o DNA da micobactéria em estudo é amplificado por PCR e depois utilizado para hibridação. Nas membranas de hibridação (perfil de spoligotyping), cada um dos espaçadores presentes produz uma banda escura, enquanto a inexistência de determinado espaçador é indicada pela ausência de banda na respectiva posição. O perfil de spoligotyping obtido pode ser transformado em código binário (0 representa a ausência da sequência espaçadora e 1 a presença da mesma), tornando possível a comparação do perfil obtido com outros existentes em bases de dados internacionais como Mbovis.org (Figura 5). Nesta, cada perfil é designado por SB (*Spoligotype Bovis*) seguido de quatro algarismos, como por exemplo SB1174 (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2009; Matos, 2009; Smith & Hilscher, n.d.).

Figura 5 - Exemplo de perfil de spoligotyping e respectivo código binário. Adaptado de CDC, 2009.



Legenda: Para cada espaçador a banda escura e o número 1 indicam a presença do mesmo; a ausência de banda e o número 0 indicam a inexistência do espaçador.

B) MIRU-VNTR

Esta técnica baseia-se na análise de múltiplos *loci* do genoma de microrganismos, que apresentam um número variável de repetições em tandem (VNTRs – *Variable Number Tandem Repeats*). No caso específico das micobactérias, estas repetições em tandem são conhecidas como MIRUs (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) e são sequências com cerca de 40 a 100 pares de bases dispersas em determinadas regiões intergênicas (Skuce et al., 2002; Supply et al., 2006).

A análise MIRU-VNTR permite detectar os polimorfismos existentes entre diferentes estirpes, nomeadamente a hipervariabilidade no número de MIRUs presentes em alguns dos *loci* analisados (Figura 6). Assim, através da amplificação por PCR, é possível o cálculo do número de repetições em tandem para cada *locus* em estudo, com base no tamanho do produto amplificado (Supply et al., 2001; Allix-Béguec, Harmsen, Weniger, Supply & Niemann, 2008; CDC, 2009).

Figura 6 – Comparação de um isolado de *M. bovis* com outras estirpes da base de dados online MIRU-VNTRplus, baseado no perfil MIRU-VNTR para 24 *loci*. Adaptado de Allix-Béguec et al., 2008.

ID	Species	154 MIRU02	424 MIRU04	577 ETRC	580 MIRU04	802 MIRU40	960 MIRU10	1644 MIRU16	1955 MIRU21	2059 MIRU20	2163b OUB11b	2165 ETRA	2347 MIRU29	2401 MIRU30	2461 ETRB	2531 MIRU23	2687 MIRU24	2996 MIRU26	3007 MIRU27	3171 MIRU34	3192 MIRU31	3690 MIRU39	4052 OUB26	4156 OUB4156	4348 MIRU39
7540/01	<i>M. bovis</i>	2	0	5	3	2	2	3	1	2	4	4	3	4	5	4	2	5	2	3	3	2	4	1	2
7540/01	<i>M. bovis</i>	2	0	5	3	2	2	3	1	2	4	4	3	4	5	4	2	5	2	3	3	2	4	1	2
8217/02	<i>M. bovis</i>	2	2	5	3	2	2	3	3	2	3	4	3	4	5	4	2	4	3	3	3	2	3	1	2
951/01	<i>M. bovis</i>	2	2	5	5	2	2	3	4	2	4	7	3	4	5	4	2	5	3	3	3	3	2	1	2
9564/00	<i>M. bovis</i>	2	2	5	3	2	2	2	3	2	4	7	3	4	5	4	2	6	3	3	2	2	4	1	2
8490/00	<i>M. bovis</i>	2	2	5	4	2	2	4	3	2	4	4	3	4	3	4	1	3	3	3	3	2	5	1	2

Legenda: Amarelo – Perfil MIRU-VNTR para o isolado em estudo; Rosa - Diferente número de repetições tandem num *locus* de determinada estirpe.

O número de *loci* analisados depende da espécie do MTC e da finalidade do estudo, sendo que no caso do *M. bovis*, a escolha do conjunto dos *loci* mais apropriados para genotipagem não é consensual nem está uniformizada para todos os laboratórios. Por essa razão o spoligotyping continua a ser a técnica mais utilizada em isolados de *M. bovis*. Apesar disso, a análise MIRU-VNTR tem-se revelado de grande utilidade para estudos epidemiológicos, nomeadamente ao ser utilizada em conjunto com outras técnicas, pois aumenta o poder de discriminação entre estirpes (Duarte, Domingos, Amado, Cunha & Botelho, 2010; Matos, Amado & Botelho, 2010).

3.2. TUBERCULOSE BOVINA

A tuberculose bovina é uma doença infecciosa que apresenta uma evolução geralmente crónica, com o desenvolvimento de lesões granulomatosas típicas, e que tem como agente etiológico a espécie *M. bovis*, embora possam estar envolvidos outros membros do MTC como o *M. caprae*. Atinge principalmente os bovinos mas também afecta muitas outras espécies domésticas, silváticas e o Homem. Para além dos bovinos, os animais domésticos mais susceptíveis são os caprinos e os suínos enquanto os ovinos e equinos têm uma elevada resistência natural (Radostitis, Gay, Hinchcliff & Constable, 2007).

Em animais, a evidência genética mais antiga de tuberculose foi encontrada numa espécie extinta de bisonte, datada de há cerca de 17 mil anos (Rothschild et al., 2001). No Homem, embora o agente etiológico principal da tuberculose seja o *M. tuberculosis*, existe evidência de lesões causadas pelo *M. bovis* desde os tempos pré-históricos, nomeadamente em pastores semi-nómadas infectados através do consumo de leite ou carne mal cozinhada de animais infectados (Taylor, Murphy, Hopkins, Rutland & Chistov, 2007).

Esta doença, além de ser um problema de saúde pública devido ao seu carácter zoonótico, constitui uma ameaça a espécies silváticas em risco de extinção e uma causa de avultadas perdas económicas. Estima-se que existam em todo o mundo cerca de 50 milhões de bovinos infectados e que os custos anuais desta doença atinjam os 3 biliões de dólares, devido a perdas de produtividade, restrições ao comércio e programas de erradicação da doença (Hewinson, 2001; World Organisation for Animal Health [OIE], 2009).

3.2.1. VIAS DE INFECÇÃO E TRANSMISSÃO

A transmissão da tuberculose bovina de um animal infectado para um animal potencialmente susceptível pode ocorrer por contacto directo entre animais ou indirectamente através de produtos virulentos disseminados no ambiente. No caso dos bovinos, as fontes de infecção mais habituais são outros bovinos, mas em determinadas regiões existem hospedeiros de manutenção silváticos que têm um papel muito importante na transmissão desta doença (Neill, Bryson & Pollock, 2001).

O produto virulento excretado depende da localização da infecção no hospedeiro, que nos países desenvolvidos e com programas de controlo da tuberculose bovina, está confinada na maioria dos casos ao sistema respiratório (Kazda, Pavlik, Falkinham & Hruska, 2009). Assim, a excreção de *M. bovis* pelos animais infectados ocorre principalmente através do ar expirado, secreções respiratórias e fezes (devido não só a lesões intestinais mas também à deglutição de muco contaminado originário das vias respiratórias). Existem ainda outros produtos virulentos como o leite, urina, descargas vaginais e uterinas e material purulento de abscessos cutâneos ou de lesões abertas de linfonodos periféricos (Radostitis et al., 2007).

Nos bovinos a disseminação do agente patogénico é intermitente ao longo do curso da doença, sendo a sua intensidade dependente do estadio da infecção. No entanto, mesmo numa fase inicial e na ausência de lesões visíveis, pode haver excreção de micobactérias viáveis poucos dias após a infecção (Pollock, Rodgers, Welsh & McNair, 2006).

A principal via de transmissão do *M. bovis* em bovinos é a via aerógena, através da inalação de aerossóis, que dependendo do seu tamanho podem conter micobactérias viáveis até uma hora depois da libertação (Menzies & Neill, 2000). A infecção é mais provável quanto maior a proximidade entre os animais, sendo por isso factores de risco o sistema de produção (intensivo ou extensivo), o tamanho da manada e as medidas de manejo e biossegurança da exploração (Goodchild & Clifton-Hadley, 2001).

A transmissão por via oral pode acontecer através da ingestão de leite (apenas comum em países em que esta doença é endémica, pois as lesões de tuberculose da glândula mamária ocorrem numa fase tardia da infecção) ou de pastos e água contaminados com produtos virulentos. O contágio de forma indirecta é possível uma vez que as micobactérias podem sobreviver bastante tempo no ambiente, dependendo da exposição à luz solar, temperatura

e humidade. Os climas temperados favorecem a sobrevivência do agente até cerca de seis meses, sobretudo se estiver protegido da dessecação pelo solo e material fecal (Menzies & Neill, 2000; Palmer & Waters, 2006).

Mais raramente, a infecção pode ser transmitida por via congénita (através do cordão umbilical), via intra-uterina (durante o coito ou inseminação artificial com sémen ou material contaminado) e via intra-mamária (devido a material de ordenha contaminado). Estão ainda descritos casos de transmissão através da alimentação com carcaças de animais infectados e de soluções de continuidade na pele ou mordeduras, especialmente em algumas espécies silváticas (Timoney et al., 1988; Goodchild & Clifton-Hadley, 2001; Radostitis et al., 2007).

Para o estabelecimento da infecção, os animais têm que entrar em contacto com uma dose suficiente de *M. bovis*, diferente consoante a espécie do hospedeiro, a virulência da estirpe e a porta de entrada no organismo. Existem diversos estudos sobre doses mínimas infectantes em bovinos, mas os valores mais referidos na literatura são de um a cinco bacilos pela via aerógena e de 10^7 bacilos por via oral (Palmer & Waters, 2006).

3.2.2. PATOGENIA E RESPOSTA IMUNITÁRIA

A primeira fase da infecção leva à formação do complexo primário, que corresponde à lesão desencadeada no local de entrada e no linfonodo associado (Neill et al., 2001). Uma vez que nos bovinos a principal via de infecção é a aerógena, a maioria destas lesões surge a nível torácico, nomeadamente nos pulmões e linfonodos regionais (mediastínicos e traqueo-brônquicos). Os linfonodos retrofaríngeos também estão entre os mais afectados, estando associados a lesões da mucosa do tracto respiratório superior e tonsilas. Surgem ainda algumas formas intestinais, com envolvimento dos linfonodos mesentéricos, sugerindo uma infecção por via oral ou reinfecção devido à deglutição de muco contaminado (Cassidy, 2006; Liébana et al., 2008).

Após a entrada do agente patogénico no organismo de um hospedeiro, as micobactérias são detectadas pelo seu sistema mononuclear fagocitário sendo ingeridas pelos macrófagos locais não activados. No interior destes, conseguem sobreviver e multiplicar-se uma vez que inibem a fusão do fagossoma com o lisossoma (devido à presença de sulfolípidos na membrana celular bacteriana). Estes macrófagos acabam por ser destruídos e os bacilos são libertados e de novo ingeridos por outros macrófagos de origem sanguínea, recém chegados pelo efeito da resposta inflamatória local (Biberstein & Hirsh, 2004; Olson, Barletta & Thoen, 2010).

A resposta imunitária específica à infecção é principalmente do tipo celular, sendo a produção de anticorpos tardia e com reduzido valor protector. Assim, o crescente número de macrófagos chamados ao local da infecção apresenta os antígenos por si processados, levando à activação dos linfócitos $T\gamma\delta$, $T\ CD4^+$ (Thelper) e $T\ CD8^+$ (Tcytotoxic). Os linfócitos

Th1 produzem várias citocinas importantes, como a IL-2, o TNF- α e o IFN- γ , este último responsável pela activação dos macrófagos e regulação da sua actividade bactericida (Pollock, Welsh & McNair, 2005; Welsh et al., 2005; Olson et al., 2010).

A multiplicação inicial do agente nos macrófagos conduz ao aparecimento da lesão clássica da tuberculose, o granuloma ou tubérculo, que contém um núcleo central de tecido caseoso necrótico que progride para calcificação distrófica. Esta massa central, que constitui um ambiente inóspito para a sobrevivência bacteriana, é envolvida por macrófagos activados, que assumem a forma de células epitelióides ou células gigantes de Langhans, e mais perifericamente por linfócitos e monócitos. Pode ainda existir um tecido conjuntivo fibroso a encapsular a lesão, que tem a função de a confinar (Plana, 2004; Quinn et al., 2004; Cassidy, 2006).

Dependendo da virulência do agente e da capacidade do hospedeiro em activar uma resposta imunitária eficaz, a infecção pode regredir através da eliminação do agente ou do seu sequestro num granuloma, conduzindo a um período estacionário. No entanto, também pode haver progressão da infecção através da disseminação de bacilos por via sanguínea ou linfática e por contiguidade. Esta disseminação pós-primária pode levar a quadros de tuberculose miliar aguda (nódulos muito pequenos com caseificação e calcificação precoces), de pneumonia lobular caseificante (forma atípica) ou de generalização arrastada da doença (formas nodulares com lesões fibro-caseo-calcárias). Quando há reinfecção endógena ou exógena, dão-se casos de tuberculose crónica evolutiva, sendo a reactivação de lesões antigas por colapso da resistência geral associada a quadros de tuberculose miliar aguda tardia (Plana, 2004; Peleteiro, 2009).

3.2.3. SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

A tuberculose bovina é uma doença de distribuição cosmopolita que ocorre em quase todos os países do mundo, apresentando, no entanto, prevalências variadas consoante a região. Nos países considerados em vias de desenvolvimento, a informação sobre a prevalência desta doença é escassa, uma vez que a sua vigilância e medidas de controlo são muitas vezes inadequadas ou mesmo inexistentes. Segundo um estudo de Cosivi et al. (1998), na década de 90 do século passado, 1/3 dos países africanos não tinha dados sobre a ocorrência de tuberculose bovina e apenas 20% dos países que reportavam a doença tinham programas para a sua erradicação (como a África do Sul). No continente asiático a situação era semelhante, estimando-se que 94% do gado bovino e 99% dos búfalos viviam em países sem programas de erradicação ou com programas de abrangência limitada. Na América central e do sul cerca de 70% dos 375 milhões de bovinos encontram-se em países com prevalência de tuberculose bovina igual ou superior a 1%. Exemplos disso são a Argentina e o Brasil, onde se supõe que existam 3,5 milhões de animais infectados, embora

se tenham vindo a tomar algumas medidas para o seu controlo (Cosivi et al., 1998; de Kantor & Ritacco, 2006).

Por outro lado, em muitos países europeus e outros como a Austrália, o Canadá ou Israel, a tuberculose bovina foi virtualmente erradicada, principalmente devido à existência e eficácia de programas de erradicação baseados em políticas de testagem de efectivos, abate de animais suspeitos e vigilância em matadouro. No entanto, em países como a Irlanda, os EUA e a Nova Zelândia, a tuberculose bovina está a reemergir devido à existência de hospedeiros silváticos reservatório, que têm vindo a complicar os esforços com vista à erradicação da doença (Radostitis et al., 2007; OIE, 2010).

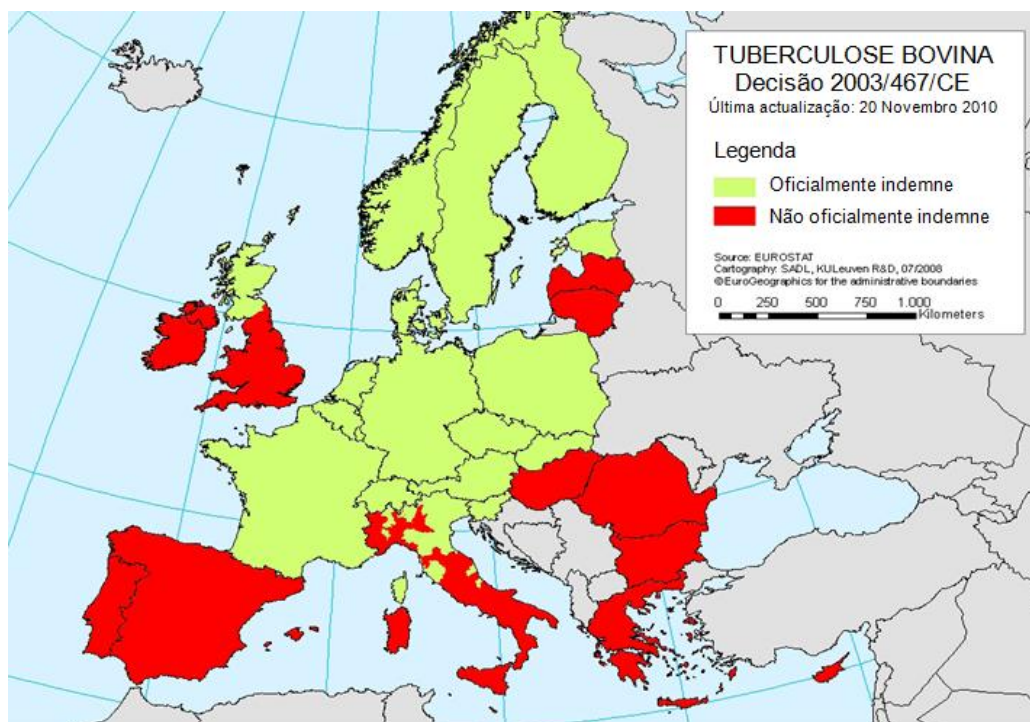
Na União Europeia, de acordo com a legislação em vigor, um Estado Membro ou região é considerado oficialmente indemne de tuberculose bovina quando as seguintes condições são cumpridas: cada animal da espécie bovina está identificado e registado de acordo com a legislação comunitária; todos os bovinos abatidos são sujeitos a uma inspecção *post mortem* oficial; a percentagem anual de efectivos confirmados como infectados não excede 0,1% durante seis anos consecutivos e pelo menos 99,9% dos efectivos têm o estatuto de oficialmente indemnes de tuberculose no final de cada ano, também durante um período de seis anos (Gordejo & Vermeersch, 2006; Directorate-General for Health and Consumers [DG SANCO], 2009).

A lista dos Estados Membros ou regiões declaradas oficialmente indemnes de tuberculose bovina constam no Anexo I da Decisão 2003/467/CE da Comissão Europeia e subsequentes emendas (Figura 7). Nesta lista, actualizada em Novembro de 2010, encontram-se 14 países (Alemanha, Áustria, Bélgica, Dinamarca, Eslováquia, Eslovénia, Estónia, Finlândia, França, Holanda, Luxemburgo, Polónia, República Checa e Suécia) e algumas regiões da Itália e do Reino Unido (Escócia).

Em alguns destes países oficialmente indemnes, a doença ainda ocorre de forma muito limitada mas, se houver uma mudança significativa nessa situação, a Comissão Europeia pode tomar a decisão de suspender ou revogar o estatuto do país em causa.

Quanto aos países não oficialmente indemnes a situação varia muito (mesmo entre regiões do mesmo país), no entanto, a tendência geral é de uma diminuição ligeira do número de explorações infectadas relativamente aos anos anteriores. Assim, dos 13 países não oficialmente indemnes, 6 reportaram não ter havido qualquer caso de explorações infectadas durante 2008, ao passo que os países do sul da Europa e Ilhas Britânicas apresentaram os valores de prevalência mais altos. As regiões mais preocupantes são o Reino Unido e a Irlanda, que nesse ano tiveram prevalências de 2,88 e 5,97 respectivamente (European Food Safety Authority [EFSA], 2010).

Figura 7 - Classificação actual dos países da União Europeia, Noruega e Suíça relativamente à tuberculose bovina. Adaptado de Decisão 2003/467/CE; Decisão 2010/695/UE e DG SANCO, 2009.

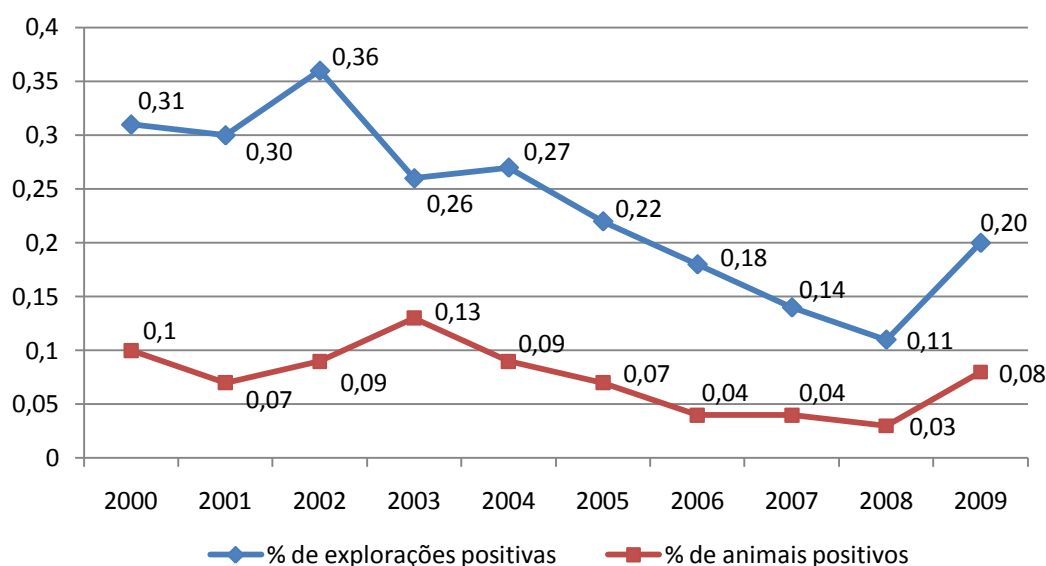


Nota: Embora não pertençam à União Europeia, os dados relativos à Noruega e Suíça são incluídos nos relatórios comunitários oficiais devido a acordos comerciais.

Em Portugal a tendência geral da prevalência da tuberculose em explorações bovinas tem melhorado lentamente desde 2000, exceptuando o ano de 2009 (Figura 8). Entre 2008 e 2009 registou-se um aumento do número de explorações positivas de 43 (com 264 animais positivos) para 76 (com 885 animais positivos). Para esta situação em muito contribuiu a região do Alentejo, onde foram reportados mais de metade do número de explorações positivas registadas em 2009, apresentando os valores mais altos nos indicadores epidemiológicos (prevalência de 1,04 e incidência de 0,81) (Direcção Geral de Veterinária [DGV], 2010).

Os estudos epidemiológicos realizados identificaram como principais factores de risco o contacto com animais silváticos (em 30% dos casos), o contacto com efectivos infectados (em 21%), a introdução de novos animais (em 21%) e o ressurgimento de infecção em explorações previamente afectadas (em 15%) (Fonseca, 2010).

Figura 8 – Tuberculose bovina: prevalência em explorações e prevalência animal em Portugal de 2000 a 2009. Adaptado de DGV, 2008 e Fonseca, 2010.



3.2.4. PROGRAMAS DE ERRADICAÇÃO

Existem planos de erradicação da tuberculose bovina, adaptados à especificidade de cada região, em vários países do mundo.

No caso específico da União Europeia, as políticas de erradicação da tuberculose bovina têm como propósito proteger a saúde pública e permitir a livre circulação de animais para o estabelecimento de um “mercado único europeu”. Assim, o objectivo final é a erradicação da doença no mais curto espaço de tempo, sendo cada estado membro o responsável primário pela mesma e podendo receber para isso apoio financeiro comunitário (Gordejo & Vermeersch, 2006).

A Directiva 64/432/CEE, relativa a problemas de fiscalização sanitária em matéria de comércio intracomunitário de animais, define as responsabilidades de cada Estado Membro, os critérios de classificação sanitária dos efectivos, as condições para a obtenção do estatuto de oficialmente indemne e os testes de diagnóstico de apoio à erradicação.

Todos os países da União Europeia que ainda não atingiram o estatuto de oficialmente indemne têm programas nacionais de erradicação da tuberculose bovina, mas apenas 5 destes (Portugal, Espanha, Irlanda, Reino Unido e Itália) tiveram programas de erradicação co-financiados para 2010.

Em Portugal, o desenvolvimento de programas de erradicação ao longo de vários anos tem permitido a melhoria do estatuto sanitário dos efectivos nacionais. O Decreto-Lei n.º 272/2000 estabelece as normas técnicas de execução do Programa de Erradicação da Tuberculose Bovina (PE) e os procedimentos relativos à classificação sanitária de efectivos e áreas em conformidade com a legislação comunitária.

A DGV é a entidade responsável pela definição de estratégias, coordenação, controlo da execução e auditoria do PE. As entidades executoras das acções de campo (rastreo e saneamento) são as Organizações de Produtores Pecuários (OPPs), que apresentam para aprovação à DGV um programa sanitário anual elaborado pelo seu Médico Veterinário Coordenador. As OPPs associam todos os criadores pecuários existentes em determinada área geográfica, de modo a que todas as explorações estejam cobertas pelas acções, sendo que cada criador associado pode escolher o médico veterinário que durante o ano irá executar as acções no seu efectivo.

Segundo a legislação, é proibida a imunoprofilaxia e o tratamento terapêutico da tuberculose bovina, consistindo o PE na testagem em vida de todos os bovinos com mais de seis semanas de idade, na vigilância em matadouro, no controlo da movimentação de animais e na classificação dos efectivos.

As classificações sanitárias actualmente existentes são T2 - não oficialmente indemne e T3 - oficialmente indemne. Para além destas classificações sanitárias o PE admite ainda as classificações T2.1 (considerada não oficialmente indemne e usada em efectivos onde houve confirmação da doença) e T3S (utilizada sempre que se suspenda a classificação sanitária a um efectivo oficialmente indemne). No Anexo 1 encontram-se esquematizados os critérios para subida e descida de estatuto sanitário dos efectivos.

O teste de diagnóstico oficial é a prova da intradermotuberculinização de comparação (IDTC), que pode ser complementado com o teste do interferão-gama (IFN- γ). As explorações positivas são sujeitas a medidas de profilaxia e polícia sanitária, nomeadamente o sequestro, isolamento e abate sanitário dos animais positivos (com colheita de amostras para diagnóstico laboratorial) e desinfecção das instalações e utensílios (DGV, 2008).

No caso de novas explorações positivas, procede-se também à realização de um inquérito epidemiológico (IE) para a investigação da história do animal, do histórico e das características da exploração e da existência ou não de entradas e saídas de animais ou contacto com espécies silváticas, com vista a descobrir a origem da infecção e impedir a sua difusão. É de destacar a importância de duas ferramentas fundamentais neste processo, que são o Sistema Nacional de Identificação e Registo Animal (SNIRA), que permite a rastreabilidade dos bovinos através de uma base de dados informatizada e o Programa Informático de Saúde Animal (PISA.net), que é o sistema de informação e gestão de saúde animal oficial e que permite o acesso a toda a informação sobre o estatuto sanitário e testes de diagnóstico de todos os animais e explorações.

Em Portugal existem alguns factores que parecem estar envolvidos na dificuldade em obter o estatuto de oficialmente indemne, como os reservatórios silváticos de *M. bovis*, as dificuldades de ordem técnica na prova da IDTC (principalmente em explorações em extensivo e em animais de raça brava) e a falta de empenho de alguns produtores que

consideram a tuberculose bovina um problema do passado (Gordejo & Vermeersch, 2006; Fonseca, 2010).

A situação dos programas de erradicação dos Estados Membros é monitorizada pela Comissão Europeia, através de uma Task Force, que tem como objectivo melhorar a eficácia das medidas de erradicação e o custo/benefício dos programas co-financiados (Gordejo & Vermeersch, 2006). O subgrupo de especialistas da Task Force para a tuberculose bovina reuniu em Portugal em Abril de 2010, deixando algumas recomendações como a necessidade de retirar maior partido das bases de dados existentes na realização de estudos epidemiológicos, de melhorar a comunicação entre as partes intervenientes, de tomar medidas para impedir o contacto dos efectivos com populações silváticas quebrando o ciclo de transmissão e avaliar os procedimentos realizados no teste da IDTC e também no controlo de qualidade da própria tuberculina utilizada (DG SANCO, 2010).

3.2.5. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da tuberculose bovina é cada vez mais raro, não só porque os sinais clínicos são inespecíficos, mas também porque a sintomatologia apenas se torna evidente em estados avançados da doença, o que é cada vez menos frequente devido à existência de planos de erradicação baseados em rastreios regulares e na eliminação precoce dos animais positivos. No entanto, o exame clínico continua a ser importante, nomeadamente nos casos avançados que não dão uma reacção positiva à tuberculinização. Assim, estes animais podem apresentar emaciação progressiva, apetite caprichoso, temperatura ondulante e, dependendo da localização das lesões, tosse intermitente e produtiva, hipertrofia dos linfonodos superficiais, mastite e metrite (Radostitis et al., 2007).

3.2.5.1. DIAGNÓSTICO *IN VIVO*

O diagnóstico *in vivo* da tuberculose bovina assenta essencialmente em testes de imunodiagnóstico, pois são capazes de detectar animais infectados em fases precoces da doença. Segundo recomendação da OIE e de acordo com a legislação europeia, o teste de rastreio utilizado baseia-se na injeção intradérmica de tuberculina e na subsequente detecção de uma reacção de hipersensibilidade do tipo IV ou retardada, traduzida por um aumento da espessura da pele no local de inoculação (OIE, 2009).

A tuberculina utilizada é um derivado proteico purificado (PPD – Purified Protein Derivative), obtido laboratorialmente a partir do crescimento e tratamento térmico de determinadas micobactérias. No caso do teste intradérmico simples utiliza-se apenas tuberculina bovina (produzida a partir de uma estirpe de *M. bovis*), enquanto no caso do teste intradérmico de comparação se usa uma tuberculina bovina e uma aviária (obtida a partir de uma estirpe de

M. avium subsp. *avium*). A prova costuma ser efectuada na região cervical (terço médio da tábua do pescoço), por ser uma zona menos suja e muito mais sensível, mas também pode ser usada a prega da cauda (Llamazares et al., 1999; Rua-Domenech et al., 2006).

Em Portugal o teste de diagnóstico oficial é a prova intradérmica de comparação e a periodicidade da sua realização depende da classificação sanitária. Assim, os efectivos T3 são sujeitos a uma testagem anual e os T2 a controlos semestrais. A prova é lida 72 horas após a inoculação e segundo o Decreto-Lei n.º 157/98, é considerada positiva quando a reacção no local de inoculação da tuberculina bovina é superior em mais de 4 milímetros relativamente à reacção da tuberculina aviária. Também são considerados positivos os animais que apresentem sinais clínicos (como edema difuso ou extenso, exsudação, necrose, dor ou reacção inflamatória dos linfonodos tributários da região de inoculação) e os animais que depois de um resultado duvidoso não tenham tido resultado negativo numa segunda prova (realizada pelo menos 42 dias depois) (DGV, 2008).

Segundo uma revisão de Rua-Domenech et al. (2006), a sensibilidade média da IDTC varia entre 75 e 95,5%. São diversas as situações que podem aumentar o número de reacções falso-negativas como: casos de infecções recentes (período pré alérgico entre 3 e 6 semanas após infecção); casos de tuberculose avançada (que provocam anergia); situações de imunossupressão (pós-parto, administração de corticosteróides e certas doenças); dessensibilização à tuberculina (não cumprimento de intervalos entre testagens); factores relacionados com a tuberculina usada e erros na técnica (Rua-Domenech et al., 2006; Radostitis et al., 2007).

A especificidade da IDTC encontra-se, segundo alguns estudos, entre 78,8 e 100%, valores superiores ao da prova simples (Rua-Domenech et al., 2006). Deste modo, o uso da IDTC possibilita um menor número de falsos positivos, pois permite diferenciar melhor animais infectados por *M. bovis* de casos de paratuberculose ou de contacto com micobactérias ambientais, que também poderiam dar resultados positivos à tuberculina bovina, devido à existência de antígenos comuns (Pollock et al., 2005).

Embora haja vários factores envolvidos na diminuição da sensibilidade e especificidade dos testes de intradermotuberculinização, estes continuam a ser os mais utilizados pois são um meio fiável e com uma boa relação custo/benefício para o rastreio de efectivos.

O teste do IFN- γ também é uma prova oficial de diagnóstico na União Europeia, sendo normalmente utilizado como teste complementar à prova da tuberculina. Em Portugal, é recomendado no âmbito do PE, sempre em paralelo com a IDTC, em explorações sem melhoria do estatuto sanitário e em testes de pré-movimentação em regiões de risco. Assim, é utilizado nas explorações T2 com animais duvidosos à IDTC e, com o objectivo de evitar o abate total, nas explorações que apresentem uma percentagem significativa de animais positivos ou em casos de positividade crónica (DGV, 2008).

Este teste é uma prova *in vitro* baseada numa resposta imunitária do tipo celular, ou seja, na libertação da citocina IFN- γ por linfócitos T sensibilizados com um antígeno específico. O teste é realizado em duas fases distintas sendo a primeira de estimulação do sangue total com tuberculina bovina e aviária durante 16 a 24 horas e a segunda de detecção e quantificação do IFN- γ produzido, através de um teste ELISA. Em animais previamente sensibilizados por *M. bovis*, há uma maior produção de IFN- γ na estimulação com a tuberculina bovina (Rua-Domenech et al., 2006).

Estima-se que a prova do IFN- γ tenha uma sensibilidade entre 73 e 100%, valores mais elevados que os da IDTC. Assim, o primeiro permite detectar um maior número de animais doentes, o que para alguns autores se deve à sua capacidade de identificar animais numa fase mais precoce da infecção, nomeadamente a partir dos 14 dias após contacto com o agente infeccioso (Pollock et al., 2005; Gormley, Doyle, Fitzsimons, McGill & Collins, 2006). Outras vantagens deste teste são a rapidez de resposta, a necessidade de apenas uma única contenção do animal, a não existência de período refractário para repetição da prova e uma interpretação mais objectiva dos resultados (Rua-Domenech et al., 2006).

No entanto, a especificidade do teste do IFN- γ é considerada inferior à da IDTC, não o tornando apropriado como teste único no rastreio de efectivos com baixas prevalências (Gormley et al., 2006). Para além disso, tem um custo mais elevado que a IDTC e algumas dificuldades logísticas inerentes, como a necessidade de entregar as amostras de sangue no laboratório até 8 horas após a colheita e de as manter a temperaturas máximas de 26°C (Rua-Domenech et al., 2006).

Embora exista evidência da influência da paratuberculose na diminuição da sensibilidade do teste do IFN- γ (Álvarez et al., 2009), a associação deste com a IDTC tem sido referida como tendo a sensibilidade máxima no diagnóstico da tuberculose, razão pela qual devem continuar a ser utilizados em conjunto nas situações indicadas (Pollock et al., 2005).

Foram desenvolvidos outros testes de diagnóstico da tuberculose, como o ensaio de proliferação de linfócitos, o teste ELISA para detecção de anticorpos (embora a resposta imunitária humoral à tuberculose seja lenta e irregular) e diversos testes serológicos, mas com pouca aplicação como testes de rotina. Existem ainda investigações com vista ao uso de novos antígenos, nomeadamente as proteínas ESAT-6 e CFP-10, que podem vir a constituir alternativas ao uso das tuberculinas actuais, aumentando a robustez dos testes existentes, e podendo mesmo vir a permitir a diferenciação entre animais não vacinados e vacinados com BCG (OIE, 2009).

3.2.5.2. DIAGNÓSTICO *POST MORTEM*

O diagnóstico *post mortem* da tuberculose bovina é efectuado pela realização de exames anátomo-histopatológicos, para detecção de lesões características, e bacteriológicos, para isolamento de bactérias do MTC, nomeadamente de *M. bovis* e de *M. caprae*.

O quadro lesional da tuberculose é complexo e varia consoante o tempo e o tipo de evolução da doença. Macroscopicamente a lesão típica é o tubérculo, que consiste numa lesão granulomatosa circunscrita, com um núcleo central de tecido caseoso necrótico que pode progredir para calcificação distrófica (Timoney et al., 1988). As lesões podem estar presentes em quase todos os órgãos e podem ter um tamanho muito reduzido (variam entre 1 milímetro e alguns centímetros), dificultando o diagnóstico anatomopatológico (Llamazares et al., 1999; Plana, 2004).

O reconhecimento das lesões macroscópicas associadas a esta doença, principalmente durante a inspecção sanitária de rotina nos matadouros, é muito importante no diagnóstico da infecção, sendo responsável pela identificação de um número considerável de novas ocorrências em explorações. No entanto, também é dificultada pelo facto de os actos de inspecção de rotina não serem tão pormenorizados como nos casos de abates sanitários de animais positivos aos testes de rastreio (Wilsmore & Taylor, 2008). No caso de abate sanitário procede-se a uma colheita obrigatória de material para análise laboratorial em todos os animais abatidos (excepto se provenientes de explorações T2.1), enquanto no abate normal para consumo isso só acontece em casos de surpresa de matadouro, ou seja, quando há detecção de lesões suspeitas.

Ao exame histopatológico, o tubérculo granulomatoso apresenta-se como um centro de necrose caseosa rodeado por células epitelióides, células gigantes de Langhans e, mais externamente, linfócitos e macrófagos. Com a evolução das lesões, observa-se um aumento do centro caseoso e diminuição das camadas periféricas, podendo estar rodeadas por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso (Plana, 2004).

Em Portugal, o Laboratório Nacional de Referência para a tuberculose bovina é o Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), que tem a função de coordenar e supervisionar tecnicamente os laboratórios regionais de diagnóstico. Se as amostras submetidas a exame histopatológico e bacteriológico permitirem a observação de lesões características de tuberculose e o isolamento bacteriano, o animal até então suspeito, é confirmado como infectado (DGV, 2008).

3.3. TUBERCULOSE EM ESPÉCIES SILVÁTICAS

A tuberculose causada por *M. bovis* e *M. caprae* afecta várias populações de animais silváticos um pouco por todo o mundo. É particularmente importante em espécies protegidas, mas também é uma preocupação pela possível transmissão aos animais domésticos e pessoas.

O estudo dos casos de tuberculose na fauna de vida livre é especialmente difícil, o que explica a dificuldade em controlar esta doença uma vez instalada nestas populações. As causas mais frequentemente apontadas para esta situação são as limitações no conhecimento das próprias populações silváticas, quer em relação ao número de indivíduos e identificação dos mesmos (normalmente apenas se sabe a sua abundância relativa), quer no que respeita à compreensão da sua importância na epidemiologia da doença (Whipple & Palmer, 2000; de Lisle, Bengis, Schmitt & O'Brien, 2002).

Também é reconhecida a dificuldade de detecção dos animais doentes nestas populações, uma vez que os sintomas são inespecíficos e estão ausentes na maioria dos animais (o sintoma mais frequente é a perda de peso que ocorre em fases avançadas da doença). Para além disso, em muitos casos não existem planos de epidemiovigilância, sendo durante a caça o único contacto que o Homem tem com estes animais. Deste modo, a detecção de tuberculose baseia-se no diagnóstico *post mortem*, através da observação de lesões características (muito importante nos animais caçados para consumo), suportado por exames histopatológicos e bacteriológicos. De referir que a aparência e distribuição das lesões podem variar nas diferentes espécies infectadas, nomeadamente entre bovinos e cervídeos (de Lisle et al., 2002; Palmer & Waters, 2006).

Em determinadas situações, como na transferência de animais para novas reservas de caça ou parques naturais, torna-se necessário a utilização de testes *in vivo*. Embora já existam testes comerciais específicos para determinadas espécies silváticas, a maioria dos testes de imunodiagnóstico que têm sido utilizados para a detecção de infecção por *M. bovis* não foram devidamente validados (Cousins & Florisson, 2005). No caso de algumas espécies de cervídeos foram desenvolvidos os testes rápidos Cervigam[®] (para detecção de IFN- γ) e CervidTB STAT-PAK[®] (para detecção de anticorpos IgM e IgG), estando ainda em processo de licenciamento (Waters et al., 2008; Gowtage-Sequeira, Paterson, Lyashchenko, Lesellier & Chambers, 2009).

3.3.1. EPIDEMIOLOGIA DOS RESERVATÓRIOS NATURAIS DA DOENÇA

Embora a tuberculose tenha sido detectada em variadas espécies silváticas, não significa que todas essas populações constituam um reservatório natural da doença. A maioria destas espécies são hospedeiros acidentais, ou seja, podem contrair a doença, mas se

houver remoção da fonte de infecção, há redução da prevalência da tuberculose, que não é mantida na população (Aranaz et al., 2004). Por outro lado, há espécies que são consideradas hospedeiros de manutenção, pois a infecção pode persistir na população apenas por transmissão horizontal. Esta capacidade de actuar como reservatório e transmitir a doença a outras espécies susceptíveis depende da prevalência da doença na população do hospedeiro de manutenção, do seu comportamento e das suas relações no ecossistema (de Lisle et al., 2002; Corner, 2006).

Existem vários exemplos destes reservatórios silváticos de tuberculose, responsáveis pela transmissão da infecção a bovinos domésticos, dificultando os esforços de erradicação da doença em determinados países. Alguns dos mais estudados são o texugo-europeu (*Meles meles*) no Reino Unido e na Irlanda e o possum (*Trichosurus vulpecula*) na Nova Zelândia, países onde se verificou uma diminuição da prevalência da doença em bovinos domésticos após campanhas sustentadas de eliminação de populações infectadas destes animais silváticos (Pfeiffer, 1994; Corner, 2006).

No estado do Michigan, nos EUA, o veado-da-virgínia ou veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) é considerado o responsável pela re-emergência da doença nos bovinos, depois de más opções de gestão desta espécie cinegética. Assim, devido à prática da suplementação alimentar no Inverno, o seu número cresceu acima da capacidade do ecossistema, favorecendo comportamentos que aumentam o risco de transmissão intra e inter-específica. Este hospedeiro de manutenção é ainda a origem de surtos em várias espécies de carnívoros, como o coiote (*Canis latrans*), o guaxinim (*Procyon lotor*), o urso-negro (*Ursus americanus*) ou a raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*), e um potencial perigo para os caçadores (Whipple & Palmer, 2000).

O búfalo-asiático ou búfalo-aquático (*Bubalus bubalis*) na Austrália é o exemplo de um hospedeiro de manutenção silvático associado a uma campanha de erradicação da tuberculose bem sucedida. Para isso foi necessário o abate total das manadas infectadas cronicamente e repovoamento com animais originários de uma população livre da doença (Pfeiffer, 1994; Corner, 2006).

Em África o reservatório natural da doença mais estudado é o búfalo-africano (*Syncerus caffer*), que se tem revelado uma fonte de disseminação da doença para os predadores, nomeadamente em parques naturais da África do Sul (Aranaz et al., 2004). Esta situação levanta crescentes preocupações na conservação de espécies ameaçadas, nomeadamente os grandes felinos, como o leão (*Panthera leo*), a chita (*Acinonyx jubatus*) ou o leopardo (*Panthera pardus*) (Bengis, Kock & Fischer, 2002).

3.3.1.1. SITUAÇÃO NA PENÍNSULA IBÉRICA

Os primeiros estudos sobre tuberculose em espécies silváticas na Península Ibérica foram realizados em Espanha. Diversos trabalhos identificaram o javali (*Sus scrofa*) e o veado (*Cervus elaphus*) como importantes reservatórios desta doença, atingindo populações geograficamente dispersas e apresentando prevalências de tuberculose elevadas (Aranaz et al., 2004; Parra, Larrasa, García, Alonso & de Mendoza, 2005; de Mendoza et al., 2006). Embora em determinados países europeus o javali seja considerado um hospedeiro accidental ou fundo de saco, diversos estudos moleculares, anatomopatológicos e epidemiológicos têm vindo a reforçar o papel do javali como reservatório no ecossistema mediterrânico (Martín-Hernando et al., 2007; Santos, 2007; Naranjo, Gortazar, Vicente & de la Fuente, 2008).

A densidade populacional de javalis e veados tem aumentado significativamente, quer por falta de predadores naturais, quer por práticas de gestão cinegética destas espécies, como por exemplo o melhoramento das vedações de reservas de caça (não relevante no caso dos javalis) e a suplementação alimentar no Verão quando as pastagens escasseiam (de Mendoza et al., 2006).

Nos veados a maioria das lesões são a nível dos pulmões e dos linfonodos retrofaríngeos, desenvolvendo granulomas com numerosos bacilos, que em casos de doença grave levam a uma excreção massiva de micobactérias através das secreções (Johnson et al., 2008). Quanto aos javalis, pensa-se que entram em contacto com o agente infeccioso através do contacto directo entre si ou do consumo de carcaças de animais doentes. Desenvolvem lesões principalmente nos linfonodos submandibulares e nos pulmões, sendo comum a existência de infecções generalizadas com lesões de grandes dimensões, que levam à excreção potencial de micobactérias por diversas vias (Santos, 2007; Naranjo et al., 2008).

Para além das características referidas anteriormente, também o comportamento destes animais e a evidência de que partilham alguns padrões de spoligotyping de *M. bovis* com o gado doméstico (Aranaz et al., 2004), fazem dos javalis e veados um factor de risco na reintrodução da doença em explorações bovinas indemnes. Também outros animais domésticos podem ser infectados, nomeadamente caprinos e o porco ibérico, em explorações de regime extensivo. Estes reservatórios naturais da doença constituem um potencial perigo para a saúde pública (sobretudo dos caçadores e manipuladores das carcaças) e também têm sido responsabilizados pela transmissão a animais ameaçados de extinção, como o lince ibérico (*Lynx pardinus*), pondo em perigo a sua preservação (de Mendoza et al., 2006).

Em Portugal, o reconhecimento da presença de tuberculose em javalis e veados é antigo (Mendes, veterinário municipal de Castelo de Vide, comunicação pessoal). No entanto, não existe nenhum plano nacional de vigilância desta doença em espécies silváticas, mas

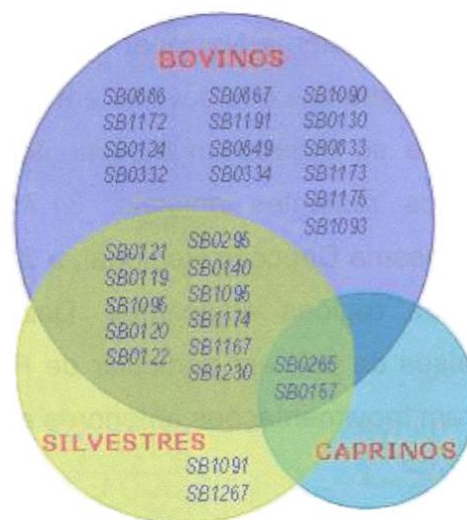
apenas acções/estudos pontuais em determinadas áreas. Deste modo, não é conhecido o estado de infecção destas populações, reconhecendo-se, contudo, que a doença grassa em determinadas zonas. Só em algumas situações são recolhidas amostras para confirmação da doença, o que levou a que em 2008 apenas tenham sido reportados 60 casos de infecção por *M. bovis* em veados e 40 em javalis (EFSA, 2008).

É de destacar a importância do conhecimento da situação da doença em Espanha, principalmente em zonas próximas à nossa fronteira, com características ecológicas semelhantes. No entanto, uma vez que o nosso país se encontra numa fase do PE em que a eventual existência de um hospedeiro de manutenção silvático pode interferir com o seu sucesso final, é imperativo que se conheça melhor a epidemiologia desta doença na fauna silvática nacional. Actualmente, esta informação resume-se apenas a alguns trabalhos recentes sobre tuberculose no javali (Santos, 2007; Santos, Geraldés, Afonso, Almeida & Correia-Neves, 2010) e sobre genotipagem de estirpes em casos de tuberculose em veados e javalis (Duarte, 2008; Matos, 2009).

Em Portugal, a prevalência de tuberculose em bovinos e a ocorrência da doença em javalis estão significativamente associadas, sugerindo uma relação entre a doença nestas espécies (Santos, 2007). Para além disso, segundo o referido autor, a presença de tuberculose em javalis está também significativamente associada com a densidade e diversidade de ungulados silváticos. Assim, o javali parece ser hospedeiro de manutenção de *M. bovis* em Portugal, e preenche as condições teóricas para poder ser considerado reservatório de tuberculose no nosso país (Santos, 2007).

Através da detecção dos padrões de spoligotyping, verifica-se uma partilha destes entre espécies domésticas e silváticas (Figura 9).

Figura 9 – Partilha de diferentes padrões de spoligotyping de *M. bovis* e *M. caprae* entre hospedeiros domésticos e silváticos. Adaptado de Duarte, 2008.



Apesar disso, a grande diversidade dos padrões encontrados em isolados de veados da mesma área geográfica sugere que estes animais constituem hospedeiros acidentais e não reservatórios da doença. Ainda assim, existem evidências sólidas da transmissão de *M. bovis* entre bovinos e veados ou javalis, não estando totalmente esclarecido o sentido da mesma (Duarte, 2008).

3.3.2. MEDIDAS DE CONTROLO

O controlo da tuberculose na fauna silvática é extremamente complicado, sendo disso exemplo o controlo parcial das populações de texugos realizado em algumas regiões do Reino Unido. Estas acções obtiveram resultados contraproducentes, pois a perturbação da estrutura social normal dos texugos levou ao aumento de migrações de animais infectados, originando um maior número de focos de tuberculose em bovinos (Independent Scientific Group on Cattle TB, 2007).

Por outro lado, o caso do búfalo-asiático na Austrália foi o único exemplo de uma campanha bem sucedida de erradicação desta doença num hospedeiro de manutenção silvático. Neste caso o método utilizado foi o abate total, mas esta medida raramente é equacionada por razões económicas, logísticas, sociais e de protecção da natureza (Bengis et al., 2002).

Em Portugal as prioridades relativamente à tuberculose em hospedeiros silváticos devem ser a determinação do papel das várias espécies na epidemiologia da doença, identificando as que constituem hospedeiros de manutenção e a determinação da distribuição geográfica da doença nessas populações. Só com estas informações será possível discutir a implementação de quaisquer estratégias de controlo em animais silváticos.

Assim, torna-se necessário desenvolver uma série de medidas preventivas como impedir o contacto entre bovinos e outras espécies e a partilha de pastagens, comedouros e bebedouros (através de vedações) e controlar a densidade das populações das espécies cinegéticas (através da não suplementação alimentar e da intensificação da caça ou da existência de planos de gestão que incluam obrigatoriedade de controlo de populações). A hipótese de vacinar os hospedeiros de manutenção silváticos é uma estratégia que necessita de dados epidemiológicos que a suportem e obriga ao desenvolvimento de uma vacina eficaz e de métodos de vacinação que garantam uma elevada taxa de cobertura vacinal (de Lisle et al., 2002).

3.3.3. INSPECÇÃO SANITÁRIA DE PEÇAS DE CAÇA MAIOR

Deve ser realizado um exame inicial *in loco* a todas as peças de caça maior (como veados e javalis) destinadas ao consumo humano, para verificar se o animal apresenta sinais que indiquem que a sua manipulação ou ingestão possam constituir um risco sanitário. Este

deve ser realizado tão cedo quanto possível pelo médico veterinário autorizado ou por uma pessoa devidamente formada (caçador, gestor cinegético ou guarda de recursos florestais com formação específica em sanidade e higiene através de cursos aprovados pela DGV), havendo rejeição total da carcaça se houver suspeita de tuberculose ou outras lesões/características anormais (Autoridade Florestal Nacional [AFN] & DGV, 2010).

O exame inicial não substitui a inspecção sanitária das peças de caça grossa. Assim, de acordo com o Regulamento (CE) 853/2004, a colocação no mercado destes exemplares de caça com vista ao consumo humano (excluindo o auto-consumo e a cedência ou partilha de carne por parte dos próprios caçadores) obriga ao seu encaminhamento, depois de realizado o exame inicial, para um centro de preparação de caça aprovado pela DGV ou matadouro licenciado para a inspecção sanitária de peças de caça. Deste modo, a comercialização de carne de caça maior só é possível depois de esta ser aprovada para consumo num estabelecimento aprovado e de lhe ser aposta a respectiva marca de salubridade (AFN & DGV, 2010; Autoridade de Segurança Alimentar e Económica [ASAE], 2010).

3.4. IMPLICAÇÕES NA SAÚDE PÚBLICA

Na década de 1980, a tuberculose em Humanos era considerada uma doença em fase de pré-erradicação nos países industrializados, mas houve uma inversão dessa tendência, essencialmente devido à pandemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e ao aparecimento de estirpes multi-resistentes. Hoje em dia continua a ser uma das principais causas de morte no Homem a nível mundial, com particular gravidade nos países do sudoeste asiático e África subsariana. Estima-se que 1/3 da população mundial esteja infectada de forma latente e, segundo dados recentes, registaram-se 9,4 milhões de novos casos e 1,3 milhões de mortes por tuberculose durante o ano de 2008 (World Health Organization [WHO], 2009).

O envolvimento do *M. bovis* em casos de tuberculose humana foi há muito reconhecido, tendo mesmo sido considerado um dos agentes zoonóticos mais importantes da história da humanidade (Abalos & Retamal, 2004). De referir que o *M. caprae* também tem sido isolado em alguns doentes com tuberculose, nomeadamente na Alemanha, mas em geral estes casos são reportados como tuberculose humana causada por *M. bovis* (Thoen, LoBue & Kantor, 2006).

Nos países industrializados a infecção por esta espécie ocorria tradicionalmente em crianças, como tuberculose extrapulmonar (por ingestão de leite contaminado não tratado) ou em trabalhadores de matadouros e explorações de bovinos, como tuberculose pulmonar (adquirida por via inalatória). Assim, no final do século XIX e princípio do século XX, cerca

de 25% do número total de casos de tuberculose humana tinham como agente etiológico o *M. bovis*. Com o início da pasteurização do leite para consumo humano e a instauração de medidas de controlo e erradicação da doença nos bovinos ao longo do século XX, estes valores desceram para 1 a 2% (Hlavsa et al., 2008).

Na União Europeia foram apenas reportados 109 casos humanos de tuberculose por *M. bovis* durante o ano de 2007, a maioria dos quais na Alemanha e Reino Unido. Portugal não reportou nenhum caso no período compreendido entre 2002 e 2007 (EFSA, 2010). No entanto, estes dados têm que ser interpretados com cautela uma vez que a maioria dos países não investiga rotineiramente qual a espécie envolvida, levando ao não reconhecimento de casos de zoonose.

A maioria dos casos reportados são de indivíduos com mais de 65 anos podendo corresponder à reactivação de infecções adquiridas na infância, quando a tuberculose nos bovinos era comum. Em indivíduos mais novos as infecções reduzem-se a surtos esporádicos, sendo muitas vezes associados à sua reemergência em emigrantes provenientes de regiões onde a doença tem uma prevalência elevada, ao consumo de produtos lácteos não pasteurizados originários dessas zonas e à co-infecção com o HIV. Também são fonte de preocupação as infecções em trabalhadores que possam contactar com animais doentes (como tratadores e magarefes) e a existência de reservatórios silváticos de *M. bovis*, que pode ser transmitido ao Homem através de actividades como a caça (Thoen et al., 2006).

Nos países em vias de desenvolvimento, nomeadamente em África, onde a tuberculose nos bovinos ainda é comum, estima-se que 10 a 15% dos casos de tuberculose humana sejam causados por *M. bovis*, principalmente devido ao consumo de leite não pasteurizado e do contacto directo com gado infectado (Regassa, Medhin & Ameni, 2008). Apesar disso, não há uma noção precisa da proporção destas infecções, uma vez que a maioria dos diagnósticos são efectuados apenas por observação microscópica de esfregaços. A situação destes países é agravada pela crescente vulnerabilidade das populações devido a pobreza extrema, dificuldade de acesso a cuidados de saúde e infecção pelo HIV (Abalos & Retamal, 2004; Michel, Muller & van Helden, 2009).

4. OBJECTIVOS

A aplicação de programas de erradicação da tuberculose bovina, ao longo de vários anos, tem permitido a melhoria do estatuto sanitário dos efectivos nacionais. No entanto, devido à sua importância sanitária e económica, esta doença continua a ser motivo de preocupação para as entidades oficiais e para os produtores.

Estando Portugal numa fase de pré-erradicação da tuberculose bovina, é importante tentar compreender as causas associadas a uma maior dificuldade na sua erradicação em determinadas regiões do nosso país. Neste contexto, pretende-se contribuir para uma melhor caracterização da epidemiologia da doença na área de intervenção da DIV Portalegre.

Assim, os objectivos específicos deste trabalho são:

- a) Identificar as explorações de bovinos com surtos confirmados de tuberculose bovina entre 2005 e 2009.
- b) Caracterizar as diferentes explorações referidas, com base no tamanho do efectivo, no tipo de produção, na evolução da doença com o tempo, na área onde estão inseridas e na possibilidade de contacto com espécies de caça grossa.
- c) Recolher amostras biológicas para diagnóstico de infecção por *M. bovis* ou *M. caprae*, em veados e javalis de zonas de caça na área das explorações em estudo.
- d) Comparar o perfil de spoligotyping de eventuais isolamentos de bactérias do MTC em animais silváticos, com estudos publicados de isolamentos em bovinos desta região.
- e) Inferir uma eventual relação epidemiológica entre os surtos de tuberculose em espécies domésticas e a sua ocorrência em espécies silváticas.

5.ACTIVIDADE I - FOCOS DE TUBERCULOSE NA DIV PORTALEGRE

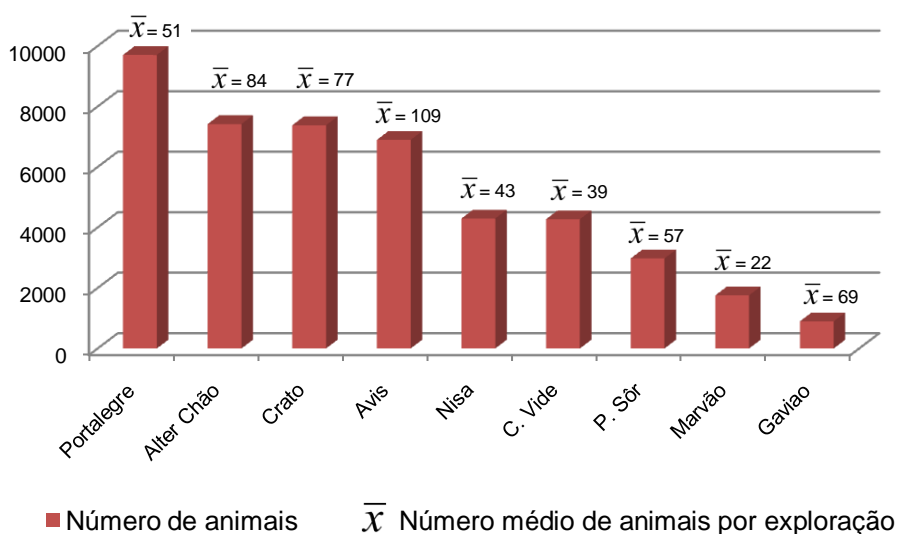
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA EM ESTUDO

Na região do Alentejo, segundo dados oficiais do PISA.net, estão apenas 11% do número de explorações de bovinos do continente, mas esta é a região que tem a maior percentagem do efectivo reprodutor (39%). Deste modo, a maioria das explorações de bovinos no Alentejo são propriedades vastas com efectivos de aptidão carne de grandes dimensões, criados em regime extensivo.

A área de intervenção da DIV Portalegre compreende os concelhos de Alter do Chão, Avis, Castelo de Vide, Crato, Gavião, Marvão, Nisa, Ponte de Sôr e Portalegre. Embora nestes concelhos também predominem as explorações de grandes dimensões de bovinos de carne, existem áreas de produção leiteira importante e também explorações do tipo familiar com um menor número de animais.

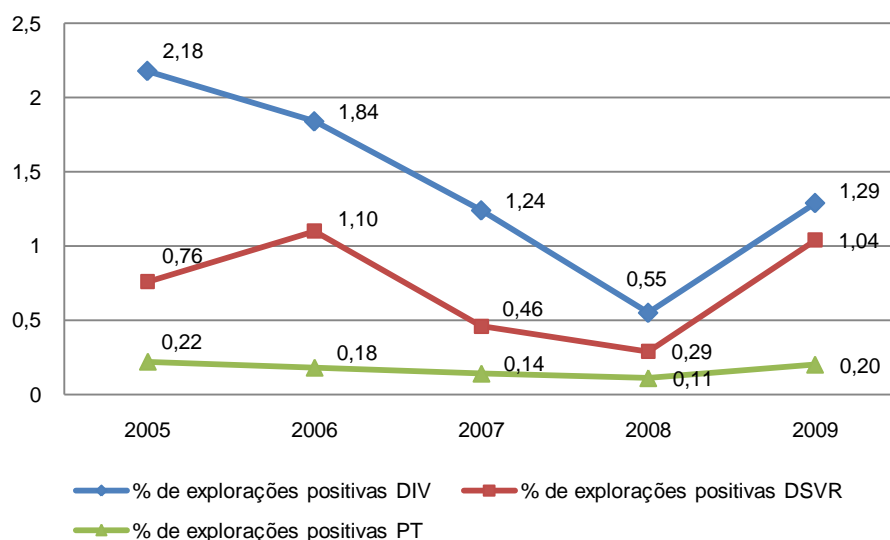
Segundo dados de 2008, nesta região existem cerca de 45000 bovinos reprodutores, distribuídos desigualmente pelos concelhos. Estes animais encontram-se em cerca de 800 explorações, sendo a média de animais reprodutores por exploração de 61, mas, por motivos socioeconómicos e geográficos, a realidade de cada concelho é distinta. As explorações com maiores efectivos encontram-se em Avis, Alter do Chão e Crato, respectivamente com uma média de 109, 84 e 77 animais reprodutores por exploração. Por outro lado, a situação de Marvão, Castelo de Vide e Nisa é bastante diferente, com médias de apenas 22, 39 e 43 animais reprodutores, respectivamente (Figura 10).

Figura 10 – Distribuição do efectivo bovino reprodutor por concelho e média de animais por exploração. Fonte: PISA.net.



A situação epidemiológica de Portugal em relação à tuberculose bovina varia de acordo com a região considerada. Como se pode ver pelo gráfico da Figura 11, os valores da prevalência desta doença em explorações no Alentejo, e em particular na DIV Portalegre, são bastante mais elevados que a média nacional.

Figura 11 – Prevalência de tuberculose bovina em explorações entre 2005 e 2009. Comparação entre os valores nacionais (PT), da DSVR do Alentejo e da DIV Portalegre. Fonte: PISA.net.



5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. RECOLHA DE DADOS

Numa primeira fase, a recolha de dados para este trabalho consistiu na identificação das explorações onde surgiram casos de tuberculose entre 2005 e 2009 e na caracterização dos mesmos. Com esse objectivo, recorreu-se ao PISA.net e aos arquivos da DIV Portalegre onde está registado o historial sanitário de cada exploração. Foram pesquisadas todas as intervenções de saneamento efectuadas, os resultados de todas as provas de diagnóstico, as surpresas de matadouro e as medidas de polícia sanitária que foram tomadas. Não foram incluídos os casos onde surgiram animais suspeitos e em que não houve confirmação de infecção (através do isolamento bacteriológico ou da observação de lesões características de tuberculose nos exames histopatológicos). Também não foram registados os casos de explorações com descida de estatuto sanitário por incumprimentos ao PE, por outros motivos além da confirmação da infecção.

Seguidamente procedeu-se à pesquisa da localização de cada uma das explorações identificadas, através dos programas IGeoE-SIG (um visualizador de informação geográfica online do Instituto Geográfico do Exército) e do Google Earth. Com estes programas foi possível localizar as explorações nas cartas militares nacionais e visualizar as coordenadas geográficas respectivas.

Finalmente, procedeu-se à identificação das zonas de caça existentes nas proximidades das explorações em estudo, através da consulta dos arquivos e da base de dados informática da Autoridade Florestal Nacional (AFN) relativa a zonas de caça. Foram também registados os resultados das épocas venatórias compreendidas entre 2004/2005 e 2008/2009, no que respeita às espécies de caça grossa.

5.2.2. PROCESSAMENTO DOS DADOS

A informação recolhida foi armazenada numa base de dados criada com o programa Microsoft Office Excel 2007, com o qual também foram realizados os gráficos e tabelas em que se apresentam alguns resultados. Em relação ao tamanho do efectivo de cada exploração, foram considerados os valores constantes nos respectivos inquéritos epidemiológicos, realizados após a confirmação do foco de tuberculose. As explorações foram classificadas pelo autor, de acordo com o número de animais, nas seguintes classes: menos de 50, entre 50 e 99, entre 100 e 249, entre 250 e 499 e 500 ou mais.

Para a georreferenciação dos focos de tuberculose foi utilizado o sistema de informação geográfica gvSIG versão 1.10, um programa informático de livre acesso desenvolvido pela *Conselleria d'Infraestructures i Transports* da Comunidade de Valência, com o apoio da União Europeia.

5.3. RESULTADOS

Durante o período em análise ocorreram 26 novos focos de tuberculose bovina, registando-se um total de 35 focos activos (efectivos/explorações onde esta doença foi detectada e confirmada em pelo menos um animal). Na Tabela 1 é apresentada uma descrição detalhada dos focos de tuberculose em estudo e na Figura 12 é indicada a localização dos mesmos. Por motivos de confidencialidade não se apresentam dados que permitam identificar as explorações em causa, como as marcas de exploração, tendo sido atribuído um código para cada uma delas (constituído por duas letras referentes ao concelho onde estão situadas e um número aleatório). Pela mesma razão, também foram atribuídos códigos às zonas de caça mencionadas neste trabalho.

Tabela 1 - Descrição dos focos activos de tuberculose bovina na DIV Portalegre, entre 2005 e 2009.

Exploração	Concelho	Aptidão produtiva	Tamanho do efectivo	Ocorrências de Tuberculose				
				2005	2006	2007	2008	2009
AC1	Alter do Chão	Carne	100-249		✓			
AC2	Alter do Chão	Carne	100-249			✓		
AV1	Avis	Carne	100-249					✓
AV2*	Avis	Carne	50-99	✓	✓	✓	✓	✓
AV3	Avis	Carne	≥500			✓		
AV4	Avis	Carne	100-249				✓	✓
AV5	Avis	Carne	50-99	✓				
AV6	Avis	Carne (engorda)	100-249					✓
AV7	Avis	Carne	100-249	✓		✓	✓	
CV1*	Castelo de Vide	Carne	50-99	✓	✓	✓		
CV2	Castelo de Vide	Carne	50-99		✓			
CV3*	Castelo de Vide	Carne	100-249	✓	✓			
CV4	Castelo de Vide	Carne	50-99				✓	
CV5	Castelo de Vide	Carne	<50		✓	✓		
CV6	Castelo de Vide	Carne	<50		✓			
CV7	Castelo de Vide	Carne	<50		✓			
CV8*	Castelo de Vide	Carne + leite	<50	✓	✓			
CV9	Castelo de Vide	Carne	50-99		✓		✓	✓
CV10	Castelo de Vide	Carne	100-249	✓	✓			✓
CV11	Castelo de Vide	Carne	<50				✓	
CV12*	Castelo de Vide	Carne	<50	✓	✓		✓	
CV13	Castelo de Vide	Carne	50-99	✓				
CR1	Crato	Carne	100-249				✓	
CR2	Crato	Carne	≥500				✓	
CR3	Crato	Carne	50-99			✓		
CR4	Crato	Carne	100-249				✓	
CR5	Crato	Carne	250-500		✓			

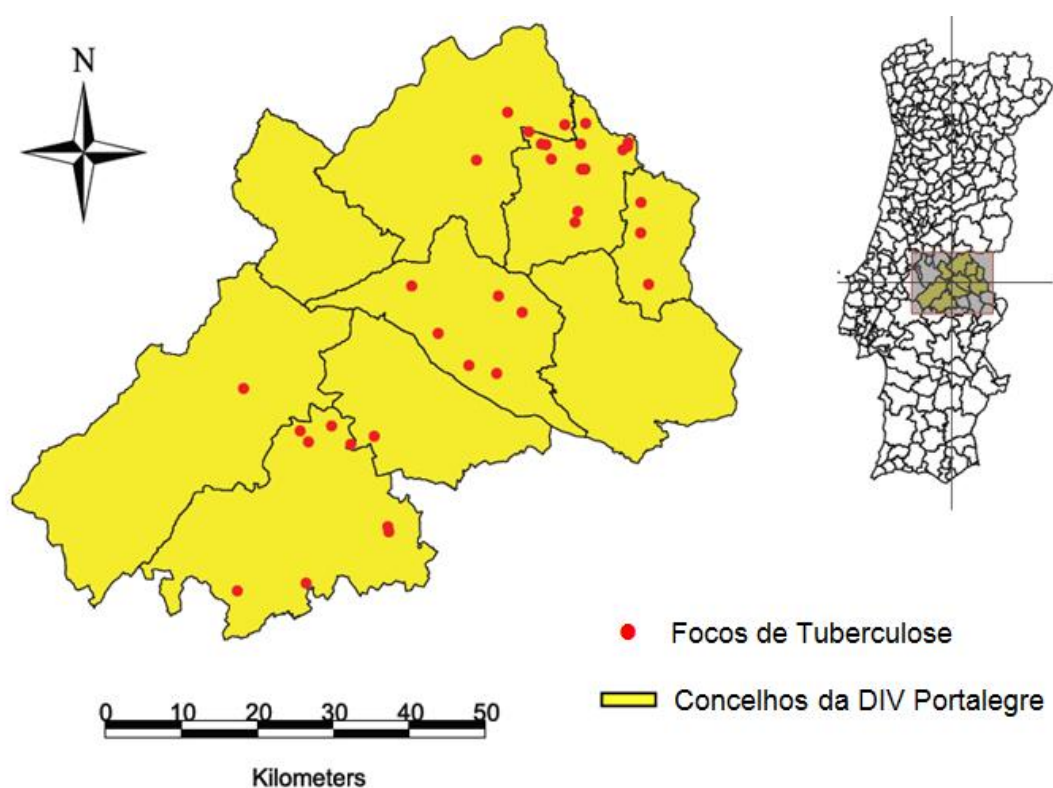
Tabela 1 - Descrição dos focos activos de tuberculose bovina na DIV Portalegre, entre 2005 e 2009.
(continuação)

CR6*	Crato	Carne	100-249	✓	✓	✓	✓	
MA1*	Marvão	Carne	<50	✓				
MA2*	Marvão	Carne	50-99	✓				
MA3	Marvão	Carne	<50	✓				
NI1	Nisa	Carne	<50	✓				
NI2*	Nisa	Carne	<50	✓				
NI3	Nisa	Carne	100-249					✓
PS1	Ponte de Sôr	Carne	<50			✓		

Legenda: ✓ - Ocorrência de pelo menos 1 caso de tuberculose bovina no ano indicado;

* - Focos detectados em anos anteriores, mas com casos confirmados no período em análise.

Figura 12 – Localização dos focos activos de tuberculose bovina na DIV Portalegre, entre 2005 e 2009.



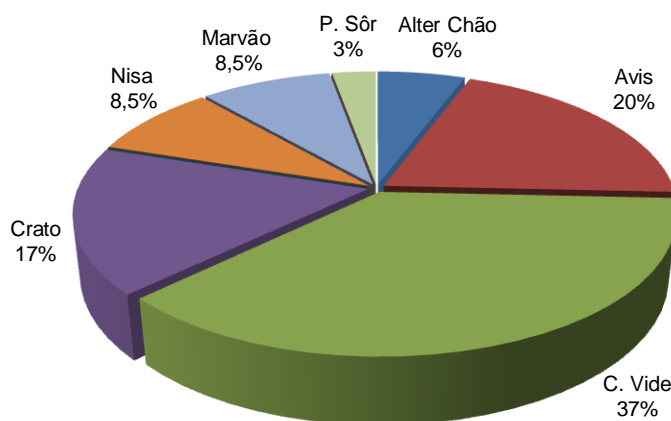
(criado a partir do software informático gvSIG 1.10)

5.3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS EXPLORAÇÕES EM ESTUDO

Apenas uma das explorações estudadas apresentava produção mista de carne e leite, enquanto as restantes tinham exclusivamente animais de aptidão carne, de raças autóctones (alentejana, mertolenga e preta) ou exóticas (limousine e charolesa). A grande maioria destas explorações de produção de carne tinha como finalidade produção de vitelos (constituídas por vacas reprodutoras aleitantes, efectivo de substituição e vitelos em desmame) e apenas uma era de recria e engorda (constituída por novilhos e novilhas não reprodutores, destinados a recria e acabamento até ao envio para abate). Deste modo, quase todas as explorações tinham um sistema de produção extensivo (que utiliza o pastoreio no seu processo produtivo, com valores de encabeçamento reduzidos), excepto a última que se considerou como um sistema semi-intensivo ou intensivo ao ar livre (desenvolvido em espaço aberto, com reduzido recurso a instalações fixas, mas com taxas altas de encabeçamento).

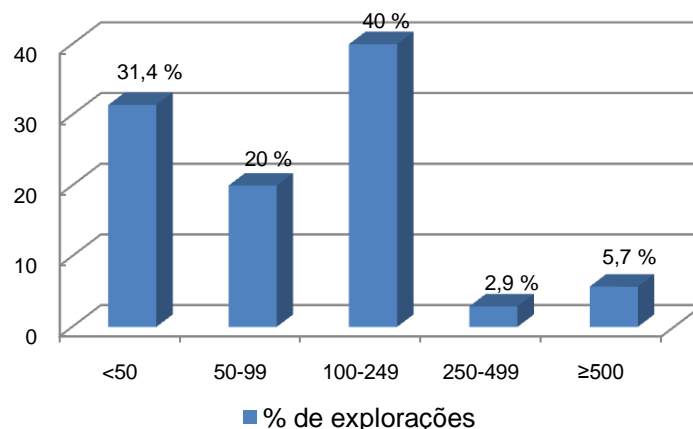
A maioria das explorações encontrava-se nos concelhos de Castelo de Vide (13), Avis (7) e Crato (6). As restantes situavam-se nos concelhos de Marvão (3), Nisa (3), Alter do Chão (2) e Ponte de Sôr (1). Nos concelhos de Gavião e Portalegre não se detectou nenhuma exploração com qualquer foco de tuberculose no período em estudo (Figura 13).

Figura 13 – Distribuição dos focos activos de tuberculose bovina por concelho.



Em relação à dimensão do efectivo, doze explorações tinham menos de 50 animais, a maioria das quais situava-se em Castelo de Vide, sendo o perfil de exploração mais encontrado neste concelho e nos de Marvão e Nisa. Com um número de animais entre 50 e 99 registaram-se sete explorações e entre 100 e 249 animais contabilizaram-se catorze. Apenas uma exploração tinha entre 250 e 499 animais e duas tinham mais de 500 bovinos (Figura 14). De assinalar, ainda, que para além de bovinos, doze explorações tinham também ovinos e/ou caprinos e uma tinha ovinos, caprinos e suínos.

Figura 14 – Distribuição das explorações em estudo por dimensão do efectivo.



5.3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS FOCOS DE TUBERCULOSE

Considerando os 35 focos de tuberculose activos, apenas em 4 situações (11% dos casos) houve recorrência da doença durante o período em análise (nas explorações AV7, CV9, CV10 e CV12). Isto significa que, depois de efectuado o processo de saneamento descrito no PE e de recuperarem o estatuto T3, estes 4 efectivos voltaram a ter casos confirmados de tuberculose. Nos restantes focos, após a detecção da doença foram tomadas as acções de saneamento necessárias para a subida do estatuto, tendo esse objectivo sido alcançado (no próprio ano de detecção, como em AC1, ou após vários anos de saneamento, como em CR6), ou continuando em saneamento após o período em análise (como em AV2).

Na Tabela 2 diferencia-se o modo como foram detectados os novos focos de tuberculose no período em estudo - através do aparecimento de animais positivos nos testes de rastreio (na exploração) ou através da detecção de surpresas de abate (em matadouro) - e qual o exame que confirmou a infecção (exame histopatológico e/ou bacteriológico).

Tabela 2 – Modo de detecção e confirmação dos novos focos de tuberculose, entre 2005 e 2009.

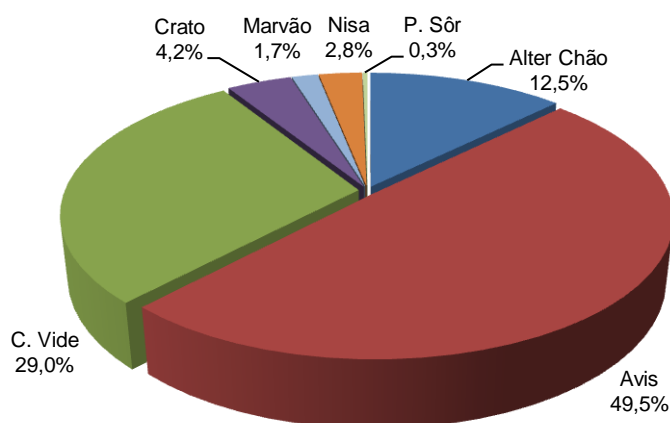
Modo de detecção dos focos	Total	%	Exame de confirmação da infecção			
			H+B	H	B	?
Em matadouro	17	65,4	5	7	3	2
Na exploração	9	34,6	2	4	0	3
Total	26	100	7	11	3	5

Legenda: H+B – Histopatologia e bacteriologia; H – Só histopatologia; B – Só bacteriologia; ? – Pelo menos um exame positivo, mas sem confirmação de qual.

Durante os anos em estudo, foram objecto de abate sanitário por suspeita de tuberculose 316 bovinos positivos aos testes de diagnóstico (IDTC e/ou IFN- γ), provenientes de todos os focos em análise. Note-se que os exames laboratoriais (histopatologia e bacteriologia) não são realizados em todos os abates sanitários, uma vez que no caso de animais provenientes de explorações já reconhecidas como infectadas (efectivos T2.1) não é obrigatório recolher amostras para análise. Nestes casos, muitas vezes só se realiza uma inspecção sanitária mais pormenorizada. Além dos anteriores, 46 bovinos apresentaram lesões compatíveis com tuberculose no momento do abate. No entanto, apenas 26 destes foram designados surpresas de matadouro, uma vez que os restantes eram provenientes de efectivos T2.1 (logo não são considerados surpresas de matadouro nem se procede a colheita de amostras para confirmação laboratorial).

No total dos 362 animais suspeitos, a maioria era proveniente de explorações dos concelhos de Avis (179), Castelo de Vide (105) e Alter do Chão (46). Os restantes eram originários dos concelhos de Crato (15), Nisa (10), Marvão (6) e Ponte de Sôr (1) (Figura 15).

Figura 15 - Distribuição dos animais suspeitos de tuberculose bovina por concelho.



5.3.3. ORIGEM DA DOENÇA NAS EXPLORAÇÕES / POSSIBILIDADE DE CONTACTOS ENTRE ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVÁTICOS

Apenas foi possível determinar a origem provável da infecção numa exploração. Tratou-se da AV6, na qual houve entrada de animais de uma exploração onde a doença veio a ser confirmada posteriormente (AV1).

Nas restantes, não houve referência no IE à presença de factores de risco como possíveis contactos com animais de explorações infectadas (risco de vizinhança e de introdução de animais infectados), mas foi muitas vezes referida a possibilidade de contacto com animais silváticos, como veados e javalis.

Na Tabela 3 é apresentada uma lista com o risco de contacto entre bovinos e espécies de caça maior existentes em zonas de caça onde as explorações em estudo estão inseridas ou com as quais fazem fronteira. Também é indicado se no IE de cada exploração foi feita referência ao risco desse contacto como possível origem da infecção. A frequência indicada para cada uma das espécies é baseada no Plano de Gestão de cada zona de caça e nos seus resultados de exploração cinegética comunicados à AFN.

Apenas 3 explorações (CV4, MA1 e MA2) não se encontram próximas de zonas de caça grossa. No entanto, isso não impede eventuais contactos com animais silváticos, nomeadamente com javalis, pois estes encontram-se em grande número nesta região e as vedações utilizadas não impedem a sua entrada nas explorações (Figura 16).

Tabela 3 – Explorações inseridas em zonas de caça grossa e espécies silváticas existentes.

Explorações	Zonas de Caça	Área ZC (ha)	Espécies de caça grossa		
			Javali	Veado	Gamo / Muflão
AC1	ZCA 2	1733	+	-	-
AC2	ZCA 3	340	+	-	-
AV1; AV4	ZCA 5	1263	+	-	-
AV2; AV7*	ZCT 4	4886	++	+++	+
AV3	ZCA 8	2204	++	-	-
AV5	ZCA 13	1470	+	-	-
AV6	ZCT 5	372	+	-	-
CR1	ZCM 2	1714	+	-	-
CR2; CR3	ZCA 4	1965	+	-	-
CR4	ZCA 6	394	+	-	-
CR5	ZCA 9	996	+	+	-
CR6	ZCA 12	409	+	-	-
CV1*; CV10; CV12*	ZCT 2	2017	+++	++	+
CV5*; CV9*; CV13; NI2*	ZCT 1	1956	+++	++	+
CV2; CV11	ZCM 1	3487	+	-	-
CV3	ZCT 3	2265	+++	+++	+
CV6; CV7; CV8	ZCA 1	3856	+++	++	+
MA3	ZCA 7	294	+	-	-
NI1; NI3*	ZCA 11	5326	+++	++	-
PS1	ZCA 10	1119	+	-	-

Legenda: “+++” Muito abundante; “++” Abundante; “+” Frequente; “-” Não referido no Plano de Gestão da zona de caça; * - Referência no IE a contacto com caça grossa como possível origem da infecção; ZCA - ZC Associativa; ZCM - ZC Municipal; ZCT - ZC Turística.

Figura 16 – Exemplos de vedação utilizada para delimitar as explorações pecuárias.



Legenda: A – Rede apropriada e em boas condições para evitar a passagem de javalis e veados; B – Rede em boas condições mas passível de não resistir ao foçar de um javali; C e D – Vedação inapropriada para impedir a entrada de animais silváticos numa exploração.

(Fotografias cedidas por João Domingos).

5.4. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, têm surgido vários surtos de tuberculose bovina na área de intervenção da DIV Portalegre, sem que se consiga ter certezas quanto à origem da infecção. Tendo em conta a natureza deste trabalho, não seria um objectivo realista tentar obter uma conclusão nesse sentido. Os resultados aqui apresentados permitem sim, conhecer melhor a realidade desta região no que respeita a esta doença, constituindo um ponto de partida para futuras análises epidemiológicas mais pormenorizadas. Este estudo incide nos 35 focos activos nesta zona entre 2005 e 2009 (incluindo focos activos detectados anteriormente e novos focos descobertos neste período) e procura caracterizá-los e discutir hipóteses quanto à sua origem. Deste modo, foram apenas incluídos os casos onde houve confirmação da doença, excluindo as explorações onde só houve animais suspeitos sem confirmação laboratorial da infecção, uma vez que não era um dos objectivos a análise dos casos falso-positivos à prova da IDTC ou de suspeitas de matadouro não confirmadas.

Embora tenha sido possível determinar a localização geográfica das explorações com focos de tuberculose e a proximidade destas em relação a zonas de caça com espécies de caça grossa, não se conseguiu obter em tempo útil os parcelários de ambas (informação sobre a

área geográfica ocupada pela exploração agrícola ou cinegética). Com esses dados teria sido possível construir mapas e avaliar as zonas de contacto de uma exploração com explorações vizinhas e com zonas de caça, permitindo uma melhor análise de dois factores de risco muito importantes na transmissão desta doença (risco de vizinhança e de contacto com animais silváticos).

Neste estudo, mais de metade dos novos focos de tuberculose (65%) foram detectados a partir de surpresas de matadouro, o que significa que nestes casos a primeira linha de detecção da doença (IDTC) falhou. Com o aproximar da erradicação da doença, o número de casos detectados em matadouro tende a aumentar, devido ao aparecimento de animais falso-negativos aos testes de rastreio. No entanto, o valor obtido foi mais alto do que seria expectável, nomeadamente em comparação com um estudo realizado a nível nacional, no qual a percentagem de detecção de novos focos através de surpresas de matadouro foi de 37% em 2004 e de 47% em 2005 (Vilhena, 2010). Estes valores são indicadores de que a vigilância no abate é extremamente importante, sendo um complemento fundamental ao PE, ao revelar animais infectados não detectados pela IDTC.

Mas este facto também levanta a questão da existência de possíveis irregularidades na execução deste teste de rastreio dos efectivos. Assim, para além de possíveis erros laboratoriais no fabrico das tuberculinas utilizadas (potência insuficiente), são vários os factores relacionados com a rotina de administração e leitura que podem levar à não detecção de animais doentes (como os erros do operador devido a falta de experiência, atenção ou profissionalismo; a deficiente contenção dos animais testados e equipamento defeituoso). Exemplos dessas irregularidades são a injeção de pouca quantidade de tuberculina, a injeção subcutânea em vez de intradérmica, a utilização de tuberculina fora de validade ou exposta a luz e calor por longos períodos, os erros na medição da prega de pele ou na identificação do animal testado e a leitura dos resultados fora do tempo recomendado (72 +/- 6 horas após a inoculação).

Depois de detectado o foco de tuberculose, as explorações em causa iniciaram o respectivo processo de saneamento com vista à recuperação do estatuto T3. Tal como foi apresentado nos resultados, houve explorações que alcançaram esse objectivo mais rapidamente que outras e algumas estavam ainda em saneamento no final deste estudo. Esta diferente demora na subida de estatuto para oficialmente indemne depende do cumprimento ou não de todos os pressupostos constantes no PE, do grau de disseminação da infecção na exploração e do controlo ou não da origem da mesma. Por outro lado importa referir os casos onde houve recorrência da doença e discutir as hipóteses para o sucedido. Assim, na origem de novos animais infectados nestas explorações poderá estar qualquer factor diferente da fonte de infecção original, a manutenção do contacto com essa fonte (quer sejam bovinos de explorações vizinhas ou animais silváticos infectados) ou mesmo uma

persistência inaparente da infecção na manada (casos de anergia crónica devido, por exemplo, a má nutrição).

A transmissão da infecção dentro de uma exploração é mais provável quanto maior a proximidade entre os animais, sendo por isso factores de risco o sistema de produção (intensivo ou extensivo), o tamanho da manada e as medidas de manejo e biossegurança da exploração (Goodchild & Clifton-Hadley, 2001). Embora a maioria dos focos detectados tenha ocorrido no concelho de Castelo de Vide, o maior número de animais positivos foi detectado em Avis. Tanto neste último concelho como em Alter do Chão, o número de animais positivos por foco foram os mais elevados (26 e 23 respectivamente), o que pode estar relacionado com o facto das explorações destes concelhos terem os efectivos de maiores dimensões (potenciando o contacto entre animais e a disseminação da infecção dentro da exploração).

No entanto, esta situação não se verificou no Crato, que embora tenha um efectivo médio elevado, contou um número de animais positivos por foco na mesma ordem de grandeza que os concelhos de Castelo de Vide, Nisa, Marvão e Ponte de Sôr (todos com 8 ou menos animais por foco). No caso do concelho do Crato, uma vez que o sistema de produção é o mesmo e o número médio de animais por exploração é quase tão elevado como em Avis e Alter do Chão, a diferença no número de animais positivos por foco poderá estar relacionada com a área disponível para os animais (menor encabeçamento permitiria menos contactos entre animais), com medidas de manejo (rotação mais frequente dos terrenos de pastagem o que reduziria o contacto dos animais com as excreções de animais doentes) ou com menor contacto com a origem da infecção.

Nos focos de tuberculose em estudo, todas as explorações, excepto uma, eram do tipo extensivo e cerca de 69% das mesmas tinham mais de 50 bovinos. De facto, um efectivo mais numeroso e um tipo de produção em extensivo, com zonas de pastagem que cobrem áreas mais vastas, podem estar associados a um aumento da facilidade de entrada da infecção, por existir uma maior probabilidade de contacto com bovinos de explorações vizinhas ou animais silváticos infectados e por ocorrerem mais substituições e entradas de animais. Estes factores foram já reconhecidos como favorecedores da transmissão da tuberculose bovina entre explorações, incluindo em Portugal (Goodchild & Clifton-Hadley, 2001; Almeida et al., 2006).

Apenas se determinou, com alguma certeza, a origem mais provável da infecção numa das explorações em análise. Neste caso, o problema foi a entrada de animais de outra exploração onde a doença foi detectada e confirmada posteriormente, levando ao sequestro da primeira. O movimento dos bovinos entre explorações é reconhecido como um dos principais factores de risco para a transmissão da tuberculose (Gilbert et al., 2005), daí a importância da implementação dos testes de pré-movimentação (salvo certas excepções, um bovino com mais de 12 meses só pode ser deslocado para outra exploração T3 se tiver

reação negativa a uma IDTC realizada no período de 30 dias anteriores à saída do efectivo de origem). São dispensados da realização de testes de pré-movimentação animais que se destinem a integrar explorações de recria e acabamento, o que aconteceu no caso do foco de tuberculose acima referido.

Nas explorações com regime extensivo, quando em épocas de carência alimentar ou deficientes condições de abeberamento, os animais tendem a concentrar-se em pontos de alimentação suplementar e bebem de fontes de água estagnada ou de curso lento, favorecendo as condições de disseminação da doença. Esta situação também se torna relevante quando falamos de animais silváticos, pois existem zonas onde estes coexistem com os animais domésticos, sem qualquer barreira ou cercado a separá-los. Para além disso, o tipo de vedações utilizadas para evitar a saída de bovinos de uma exploração pode permitir a entrada de animais silváticos de terrenos circundantes (dependendo do estado de conservação e altura da rede), nomeadamente os javalis que conseguem foçar uma passagem por baixo da mesma.

Deste modo, no caso dos javalis, em todas as explorações desta região pode haver contactos com bovinos domésticos, pois as vedações normalmente não constituem impedimento ao seu avanço na busca de comida e água. Quanto aos veados, embora a sua distribuição seja mais limitada, coabitam com os bovinos em cerca de 45% das explorações em análise (20% segundo os IE), havendo mesmo relatos de partilha de comedouros (Mendes, veterinário municipal de Castelo de Vide, comunicação pessoal). Assim, embora não se possa confirmar a origem da infecção nestes casos, e tendo sido excluídos factores de risco como movimentações de animais entre explorações ou contactos com explorações vizinhas infectadas (através da análise do SNIRA e do PISA.net), a transmissão da doença por animais silváticos torna-se uma hipótese mais provável.

De referir, também, um outro factor de risco na transmissão da tuberculose aos efectivos bovinos, cujo papel não parece ser tão importante como os já mencionados, mas que ainda não está totalmente quantificado. Trata-se do contacto com outros animais domésticos como pequenos ruminantes, suínos e equinos. Neste trabalho, existiam animais das espécies atrás referidas em cerca de 37% das explorações estudadas, sendo possível o seu contacto com os bovinos da respectiva exploração.

Os ovinos e equinos são considerados menos susceptíveis à infecção por *M. bovis* do que os caprinos e suínos, que podem ser encarados como uma fonte potencial de infecção em regiões onde haja contactos frequentes com bovinos. Deste modo, não deve ser menosprezado o risco de contaminar efectivos bovinos indemnes de tuberculose através da introdução de rebanhos de caprinos infectados (Humblet, Boschioli & Saegeman, 2009). Embora na maioria dos países industrializados a intensificação da criação de suínos tenha minimizado as possibilidades de contacto com bovinos, em Portugal isso continua a acontecer com a produção de porco em extensivo no Alentejo. Também é importante referir

a infecção por *M. caprae*, uma micobactéria que embora esteja mais adaptada aos caprinos, já foi isolada em bovinos (Duarte, 2008). Esse isolamento constitui uma confirmação de positividade para efeitos do PE que, no entanto, não engloba a monitorização de outros ruminantes domésticos.

Em relação aos focos de tuberculose em bovinos é de salientar a grande importância do IE efectuado na altura da sua detecção, em situações de ocorrência de animais positivos à IDTC ou de surpresas de matadouro em abates de rotina (Anexo 2). Este é realizado por um médico veterinário da DIV da área da exploração em causa e tem o objectivo de descobrir a origem do foco e quais os factores de risco de transmissão da infecção no efectivo e nas explorações epidemiologicamente conectadas.

Para isso recorre-se ao PISA.net e ao SNIRA, com o intuito de investigar a história do animal suspeito (movimentações), o histórico da exploração (datas e resultados de todos os rastreios dos últimos 3 anos e histórico das classificações sanitárias dos últimos 5 anos) e a existência ou não de comércio de animais nos últimos 12 meses (dados dos animais introduzidos na exploração; testes de pré-movimentação de animais introduzidos e dados dos animais saídos da exploração). Também se procede à recolha de informação laboratorial para determinação do primeiro teste de seguimento do efectivo e de informação geográfica acerca das explorações confinantes. Efectua-se, adicionalmente, uma visita à exploração para averiguar as condições de manejo e biossegurança (a aptidão e finalidade produtiva; se há um regime de pastoreio ou estabulação; as condições de higiene; as fontes de água e o destino dos efluentes e se há partilha de equipamentos com outras explorações) e a possibilidade de contacto com outros animais, nomeadamente caprinos, veados e javalis.

Infelizmente nem sempre é dada a devida importância ao IE, por falta de tempo para o efectuar na sua totalidade ou pelo facto de muitas vezes se revelar inconclusivo. Para além disso, em certas situações consegue-se estabelecer uma origem mais provável para um foco de tuberculose, mas, por impossibilidade prática ou restrições financeiras, não são realizados exames que a confirmem (como a análise molecular das estirpes envolvidas).

6. ACTIVIDADE II - ACOMPANHAMENTO DE UMA MONTARIA

6.1. CARACTERIZAÇÃO DA ZONA DE CAÇA

Em Portugal existem diferentes tipos de zonas de caça, consoante os objectivos da sua criação. De acordo com o Decreto-Lei nº 202/2004, estas zonas podem ser nacionais, municipais, associativas ou turísticas, entre outras, sendo as suas entidades gestoras responsáveis pela elaboração de planos de ordenamento e exploração cinegética. As zonas de caça turísticas (ZCT) encontram-se predominantemente na região do Alentejo (distritos de Portalegre, Évora e Beja), e caracterizam-se por privilegiar o aproveitamento económico dos recursos cinegéticos.

Acompanhou-se uma montaria na região norte do distrito de Portalegre, numa zona de caça turística de agora em diante designada por ZCT 1 (Figura 17). Esta tem cerca de 2000 hectares e encontra-se dividida entre o concelho de Nisa (freguesia de Montalvão) e o concelho de Castelo de Vide (freguesias de Santiago Maior e N.ª Sr.ª da Graça de Póvoa e Meadas).

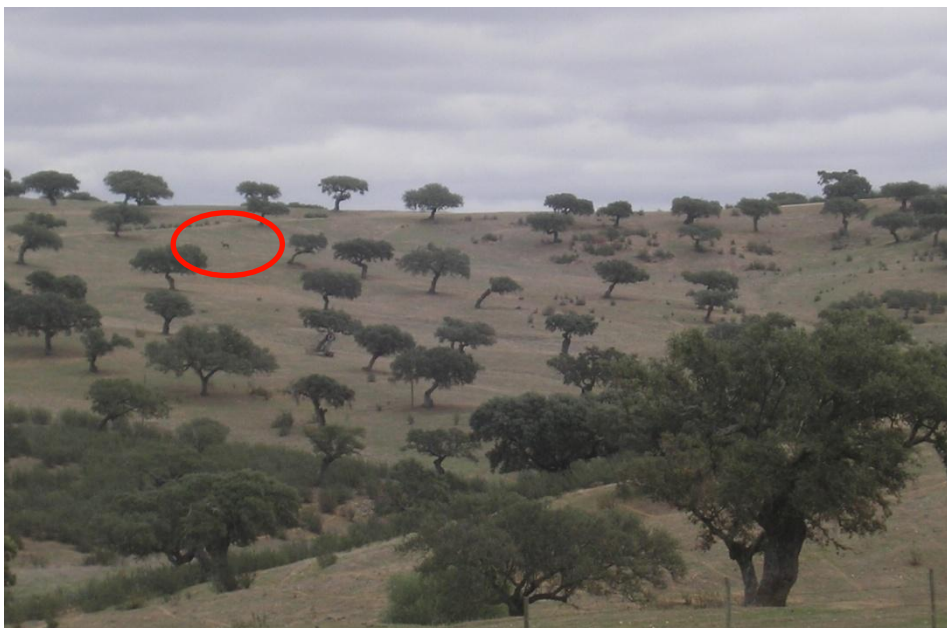
Figura 17 - Localização geográfica do pavilhão de caça da exploração cinegética da ZCT 1.



(criado a partir do software informático Google Earth e gvSIG 1.10)

Este coutado é composto por algumas zonas limpas, outras com mato e arbustos, sendo os sobreiros e as azinheiras abundantes (Figura 18). Nesta região existem outras zonas de caça turística e uma associativa, onde se realizam diferentes tipos de caçadas como as montarias ao javali, ao veado e, menos frequentemente, ao gamo. Na Tabela 4 é apresentado o resultado das caçadas a espécies de caça grossa, nas épocas venatórias compreendidas entre 2004/2005 e 2008/2009 nas referidas zonas de caça. De referir que nesta área estão inseridas algumas explorações de bovinos.

Figura 18 – Aspecto típico de um coutado alentejano.



Legenda: Em destaque um cervídeo em fuga durante uma montaria. (Fotografia original)

Tabela 4 – Resultado das épocas venatórias compreendidas entre 04/05 e 08/09 em quatro zonas de caça, para espécies de caça maior.

Zona de Caça	Área (ha)	2004/2005			2005/2006			2006/2007			2007/2008			2008/2009		
		J	V	G	J	V	G	J	V	G	J	V	G	J	V	G
ZCA 1	3856	48	-	-	63	3	-	60	-	-	59	5	-	53	10	9
ZCT 1	1956	86	9	-	-	-	-	19	3	1	60	4	1	15	3	2
ZCT 2	2017	88	7	-	65	7	-	70	8	4	79	5	2	95	4	3
ZCT 3	2265	86	31	-	45	4	-	44	31	-	24	25	-	22	11	-
Total		308	47	-	173	14	-	193	42	5	222	39	3	185	28	14

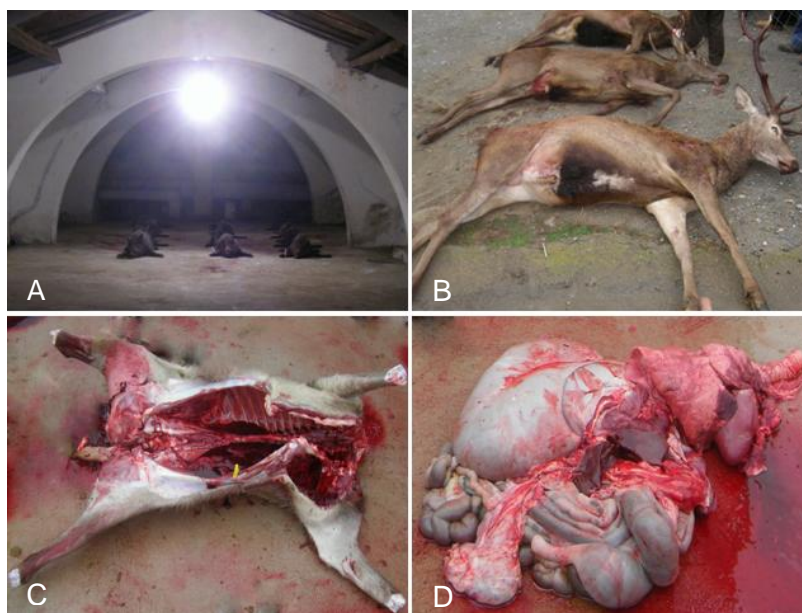
Legenda: ZCA – Zona de caça associativa; ZCT – Zona de caça turística;

J – Javalis; V – Veados; G – Gamos.

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho teve como base o acompanhamento da inspecção sanitária dos animais abatidos na montaria de 28 de Novembro de 2009 na exploração cinegética da ZCT 1. Depois de abatidos, os animais (javali e veados) foram reunidos numa sala de inspecção, onde os encarregados da desmancha procederam à evisceração e ao corte da cabeça e patas dos animais (Figura 19).

Figura 19 – Animais abatidos e procedimentos anteriores à inspecção e recolha de amostras.



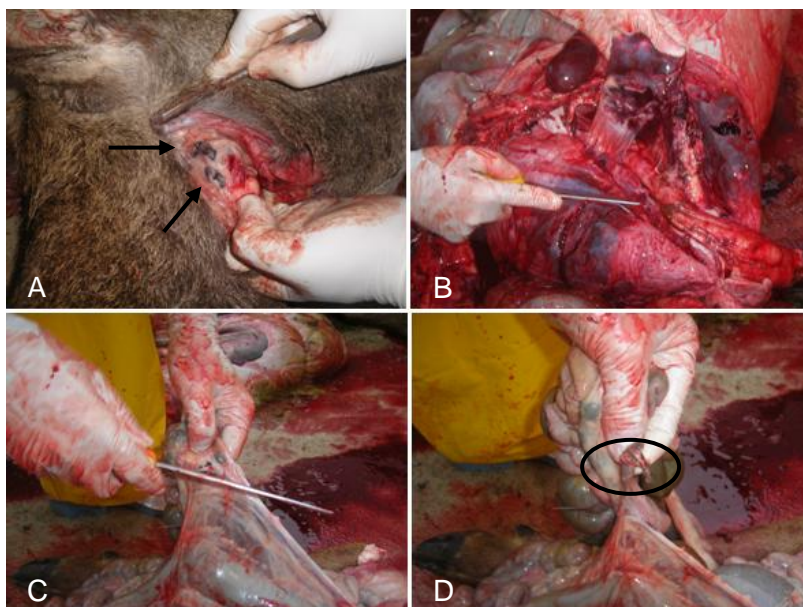
Legenda: A e B – Animais abatidos, previamente à evisceração; C – Carcaça de veado eviscerada (processo é igual no Javali); D – Grande plano das vísceras de veado, dispostas junto à carcaça respectiva de maneira a haver uma correspondência inequívoca. (Fotografias originais)

Nos procedimentos de inspecção e recolha de amostras utilizou-se um conjunto de facas, um bisturi e uma pinça de dissecação com dentes. Todos os procedimentos foram efectuados utilizando vestuário de protecção e luvas de látex.

6.2.1. INSPECÇÃO MACROSCÓPICA

Foi efectuada uma inspecção macroscópica às carcaças e vísceras torácicas e abdominais de todos os animais abatidos, com vista à detecção de lesões compatíveis com tuberculose (Figura 20). De acordo com a distribuição preferencial destas lesões em veados e javalis, foi dada especial atenção à pesquisa nos pulmões e linfonodos da cabeça (submandibulares e retrofaríngeos), traqueo-brônquicos e mesentéricos, realizando vários cortes em cada órgão.

Figura 20 – Inspeção macroscópica de um veado.



Legenda: A – Linfonodos retrofaríngeos; B – Pesquisa de lesões nas vísceras torácicas; C – Pesquisa de lesões nas vísceras abdominais; D – Linfonodo mesentérico. (Fotografias originais)

A presença de lesões caseosas, purulentas, necróticas ou calcificadas nestes órgãos levou à reprovação total das carcaças por suspeita de tuberculose.

Atendendo às dificuldades inerentes ao trabalho de campo, não foi possível realizar a pesquisa de lesões em todos os órgãos que se pretendia em alguns animais.

6.2.2. RECOLHA DE AMOSTRAS

Foram recolhidas amostras de órgãos nos animais reprovados por apresentarem lesões compatíveis com tuberculose. As amostras biológicas foram recolhidas no final das montarias, após a evisceração, e acondicionadas em copos esterilizados de 40 ml, com tampa de rosca.

Todos os recipientes foram rotulados com o número de série e o tipo de amostra (órgão ou fragmento de órgão com lesões). Numa ficha de campo foi registado o número de série da amostra, espécie, sexo, idade (foi apenas determinado se eram juvenis ou adultos) e quais as amostras recolhidas.

6.2.3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

O material recolhido no campo foi mantido a temperaturas de refrigeração durante um período inferior a 48 horas, após o qual foi processado.

As amostras para bacteriologia e histopatologia foram congeladas a -20°C e enviadas para o LNIV, através da DSVR do Alentejo (Anexo 3).

Uma amostra recolhida em duplicado foi conservada em formol a 10% e mantida à temperatura ambiente, sendo posteriormente analisada no laboratório de anatomia patológica da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV). Esta decisão de analisar na FMV amostras duplicadas prendeu-se com o facto de poder ter acesso aos resultados (lâminas de histopatologia) e de receber um relatório mais detalhado.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. INSPECÇÃO MACROSCÓPICA E RECOLHA DE AMOSTRAS

Nesta montaria foram abatidos 3 veados (machos) e 17 javalis (12 fêmeas e 5 machos), todos adultos. A totalidade das peças de caça foi sujeita a inspecção sanitária.

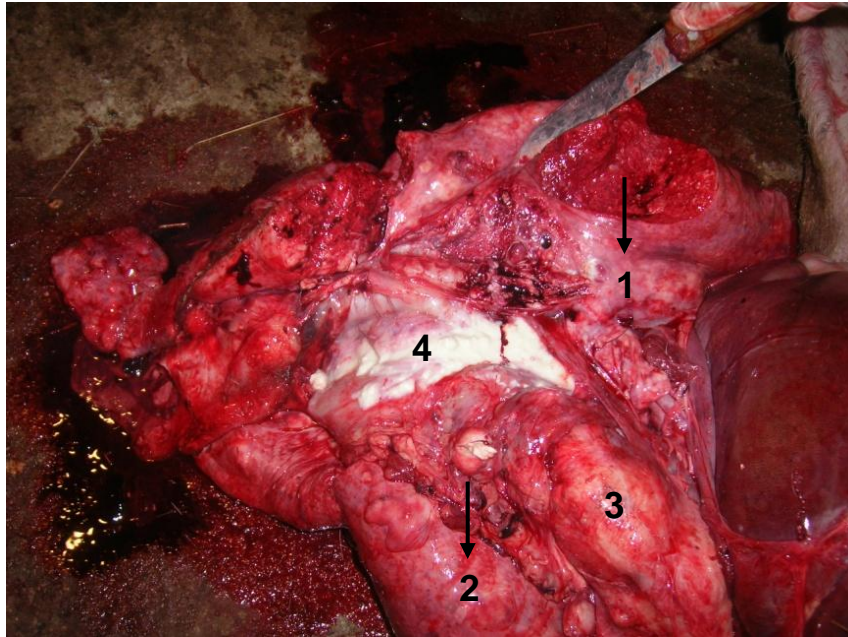
Foram rejeitados 3 animais (15% do total de animais caçados) por suspeita de tuberculose (Figura 21 e Figura 22), estando o tipo de lesões e as amostras recolhidas indicados na Tabela 5.

Tabela 5 – Animais rejeitados devido à existência de lesões compatíveis com tuberculose.

Animal rejeitado por suspeita de TB	Tipo de lesões	Amostras recolhidas
Veado	Pneumonia granulomatosa cáseo-purulenta (nódulos de diferentes dimensões)	Pulmão, linfonodo pré-escapular
Javali (M)	Linfadenite purulenta	Linfonodos submandibular e retrofaríngeo
Javali (F)	Linfadenite cáseo-necrótica com calcificação	Pulmão e linfonodos submandibular, retrofaríngeo, traqueo-brônquico e mesentérico

Legenda: M – Macho; F – Fêmea.

Figura 21 – Pulmão de veado com lesões granulomatosas cáseo-purulentas de diferentes dimensões.



Legenda: 1 – Granulomas de pequena dimensão (pontos brancos); 2 – Granuloma com conteúdo caseoso; 3 – Granuloma de grandes dimensões; 4 – Conteúdo purulento de um granuloma de grandes dimensões. (Fotografia original)

Figura 22 – Linfonodo submandibular de javali com linfadenite purulenta.



(Fotografia original)

6.3.2. TESTES DE DIAGNÓSTICO

Foram analisadas no LNIV amostras dos 3 animais rejeitados (exames histopatológicos e bacteriológicos), enquanto uma amostra de pulmão de veado, recolhida em duplicado, foi analisada na FMV (exame histopatológico). Na Tabela 6 são apresentados os resultados de todos os exames laboratoriais de diagnóstico efectuados.

Tabela 6 – Resultados dos exames laboratoriais de diagnóstico.

Animal rejeitado por suspeita de TB	LNIV		FMV
	H	B	H
Veado	+	+	+
Javali (M)	+	+	NR
Javali (F)	+	+	NR

Legenda: H – Histopatologia; B – Bacteriologia; “+” Exame positivo; NR – Exame não realizado;
M – Macho; F – Fêmea.

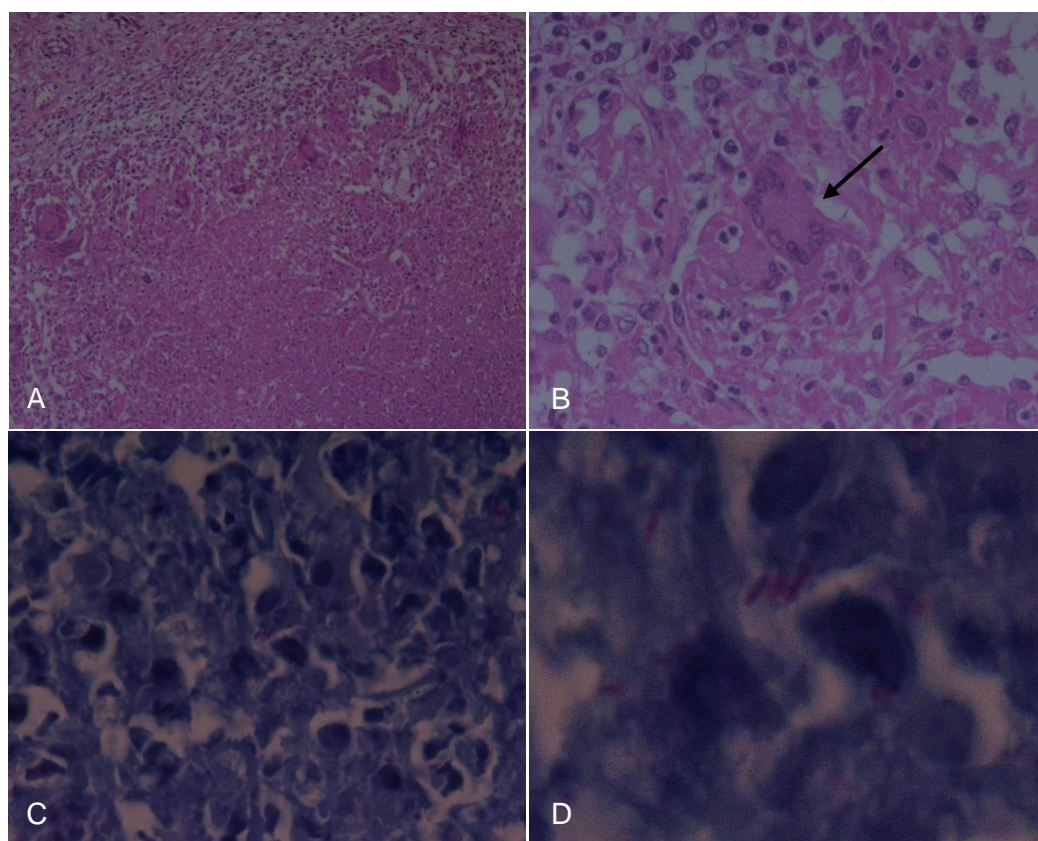
6.3.2.1. BACTERIOLOGIA

Em todas as amostras enviadas para análise foi isolado o *Mycobacterium bovis*, correspondendo a uma taxa de isolamento de 100%. Deste modo, a infecção foi confirmada em 33,3% dos veados (1 em 3 abatidos) e em 11,8% dos javalis (2 em 17 abatidos).

6.3.2.2. HISTOPATOLOGIA

De acordo com o relatório histopatológico, nas amostras dos três animais observaram-se lesões que se enquadram nas características de tuberculose, com visualização de BAAR pela coloração de Ziehl-Neelsen. Nos cortes de pulmão de veado (Figura 23) identificaram-se focos de necrose envolvidos por reacção inflamatória granulomatosa, rica em células epitelióides, contendo algumas células gigantes multinucleadas (algumas das quais do tipo Langhans, apresentando o núcleo em ferradura). Para além das lesões de grande dimensão descritas, observaram-se pequenos granulomas dispersos. Estas lesões foram associadas a um quadro de pneumonia granulomatosa por *Mycobacterium*, muito possivelmente tuberculose na forma de disseminação nodular.

Figura 23 – Microfotografias de pulmão de veado.



Legenda: A – (HE 100x) Granuloma de tuberculose (na zona central existe necrose de caseificação e à periferia observam-se linfócitos, fibroblastos e uma coroa de macrófagos, alguns dos quais formando células gigantes como as células de Langhans); B – (HE 400x) Célula de Langhans com núcleo em ferradura; C – (ZN 1000x) Bacilos Álcool-Ácido Resistentes; D – Pormenor da imagem C.

(Microfotografias cedidas pelo Laboratório de Anatomia Patológica da FMV)

6.4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos confirmam a existência de tuberculose causada por *M. bovis* em veados e javalis de vida livre numa importante região cinegética de Portugal, o Alto Alentejo. Até ao momento, não se conhecem estudos publicados acerca da detecção de tuberculose em espécies silváticas na zona de Portalegre.

Contra as expectativas do autor, não foi possível acompanhar um maior número de caçadas nesta região e efectuar mais inspecções macroscópicas a veados e javalis, com recolha de amostras para exames laboratoriais. Esta situação ficou a dever-se ao facto de o médico veterinário habitualmente responsável pelo exame inicial a peças de caça nesta área, só ter sido requisitado para uma montaria durante o período de estágio em que este estudo foi realizado.

Nesta montaria foi abatido um número de animais semelhante ao registado na época venatória anterior, para esta zona de caça. Todos os animais que apresentaram lesões macroscópicas compatíveis com tuberculose viram confirmada a infecção por *M. bovis* através do seu isolamento e dos exames histopatológicos (presença de BAAR e de lesões granulomatosas típicas). Assim, 33,3% dos veados e 11,8% dos javalis caçados nesta montaria tinham tuberculose. De referir que estes valores podiam ser superiores, mas, por razões de logística e de limitação de tempo, só foram recolhidas amostras para exames de diagnóstico aos animais rejeitados e que apresentavam lesões visíveis, compatíveis com esta doença.

A bacteriologia é o teste de referência no diagnóstico de tuberculose na fauna silvática (de Lisle et al., 2002), mas, por motivos financeiros ou outras limitações, muitos estudos apenas realizam este exame em amostras de animais com lesões macroscópicas visíveis, o que subestima a prevalência real da doença (de mendoza et al., 2006; Santos et al., 2010). Deste modo, um estudo com veados de cativeiro verificou que a sensibilidade da detecção de lesões macroscópicas era de 93% (Rohonczy et al., 1996), enquanto outros realizados em Portugal com javalis, chegaram a valores de sensibilidade de 75% (Santos, 2007) e de 72,7% (Santos et al., 2010).

Ao contrário do esperado, não foi realizada a análise molecular das estirpes isoladas pelo LNIV, possivelmente por as técnicas de genotipagem não serem aí realizadas por rotina. Este facto impossibilitou o cumprimento de um dos objectivos deste trabalho, o de comparar o perfil de spoligotyping das bactérias do MTC isoladas em animais silváticos na região de Portalegre, com estudos publicados de isolamentos em bovinos desta região.

O excesso de população de animais silváticos e a escassez de alimentos/água potenciam os contactos entre estes e animais domésticos, existindo evidências sólidas da transmissão de *M. bovis* entre bovinos e veados ou javalis, não estando totalmente esclarecido o sentido da mesma (Duarte, 2008). Deste modo, um dos factores de risco para a existência de tuberculose na fauna silvática é a existência de efectivos bovinos infectados na região em causa e a possibilidade de contactarem com os primeiros.

Também é reconhecido como um dos principais factores de risco a densidade do próprio hospedeiro silvático. De acordo com Santos (2007), a ocorrência de tuberculose em javali na Beira Interior e no Baixo Alentejo está significativamente relacionada com a densidade e diversidade de ungulados silváticos e, sobretudo, com a densidade de javali. Assim, quando uma determinada área tem um número de animais superior à sua capacidade natural, é de esperar um maior contacto entre eles e uma maior migração para outras áreas, potenciando a transmissão da infecção dentro da população e em populações de regiões limítrofes.

Uma vez que não existem dados acerca do tamanho das populações ou da densidade de veados e javalis na região de Portalegre, a única informação sobre estas espécies são os resultados das zonas de caça desta área em relação às espécies cinegéticas abatidas.

Assim, na época venatória de 2008/2009 a densidade de javalis e veados caçados nesta região foi de 1,83 e 0,28 animais por 100 hectares, respectivamente.

No entanto, embora estes valores dêem uma noção da existência destes animais nesta zona, não se podem fazer extrapolações sobre a densidade dos mesmos. Isto porque a densidade de animais caçados, para além de depender do número de animais existentes, está principalmente relacionada com as diferentes políticas de gestão das zonas de caça. Assim, a discrepância no número de animais caçados, verificada em diferentes anos e nas diferentes zonas de caça (Tabela 4), é influenciada pelo número de caçadas organizadas, número de caçadores participantes, factores ambientais que condicionam as populações animais (tanto em quantidade como em qualidade dos troféus), entre outros.

Embora não fosse um dos objectivos deste trabalho, no decorrer do mesmo foi possível aperceber-me de algumas falhas em termos de boas práticas na realização do exame inicial de espécies de caça maior. Em primeiro lugar a iluminação existente no pavilhão de caça era insuficiente para uma boa visualização de eventuais lesões nas diferentes estruturas anatómicas. Também não existiam contentores para os subprodutos (vísceras dos animais e carcaças rejeitadas), que devem ser devidamente acondicionados para que durante o transporte para o local de enterramento ou Unidade de Transformação de Subprodutos, não ocorra a contaminação do ambiente. No caso de se proceder ao enterramento, este deve fazer-se em zonas apropriadas, de modo a evitar a contaminação de lençóis freáticos e a uma profundidade suficiente para impedir a remoção por carnívoros e uma eventual ingestão de material infectado.

No entanto, o mais preocupante foi a falta de cuidado dos encarregados da desmancha em relação à sua protecção individual, ao não usarem luvas e, em alguns casos, não terem roupas protectoras para uso apenas durante o processo. Poderia ser realizado um inquérito aos intervenientes nas caçadas, para averiguar se existe uma consciência dos riscos associados às actividades de desmancha e auto-consumo de peças de caça maior, nomeadamente no que diz respeito à existência de lesões de tuberculose. Nesta jornada de caça, embora tenha existido por parte do médico veterinário responsável uma advertência no sentido de se tomarem precauções em relação à segurança pessoal, isso não se verificou. Em entrevista a essas pessoas, o autor concluiu que o problema não foi falta de conhecimento dos eventuais perigos, mas sim pouca preocupação com a gravidade e consequências dos mesmos.

Nesta montaria, todos os animais foram sujeitos a um exame inicial realizado por um médico veterinário, mas em muitas caçadas apenas está presente uma “pessoa devidamente formada”. No caso da carcaça se destinar à comercialização, é ainda sujeita a uma inspecção sanitária oficial, mas no caso de auto-consumo por parte do caçador, o exame inicial é a única oportunidade para detectar qualquer tipo de lesão. Deste modo, sabendo da

existência de doenças zoonóticas como a tuberculose, o auto-consumo pode envolver risco para a saúde, sendo, por isso, evidente, a importância do médico veterinário neste campo. Fica também a ideia da criação de uma rede nacional de epidemiovigilância de espécies cinegéticas, tal como foi implementado de modo experimental no Alto Minho, entre 2003 e 2005 (Santos, Hélder & Tavares, 2005). Tratou-se de uma rede coordenada pelos serviços veterinários regionais, que contou com a participação dos serviços florestais, federações e associações de caçadores, áreas protegidas e vários laboratórios. O seu objectivo era determinar a situação sanitária e distribuição geográfica de várias doenças com importância para a saúde humana, saúde animal ou actividade cinegética e a divulgação dos resultados junto dos grupos interessados (caçadores, criadores de animais, residentes). Assim, deveria existir uma vigilância sanitária continuada às espécies cinegéticas, nomeadamente espécies de caça maior, com estudos epidemiológicos acerca de doenças zoonóticas como a tuberculose. Também é muito importante a existência de boas práticas sanitárias na manipulação de carcaças de animais como veados e javalis de modo a proteger a saúde de todos os intervenientes, desde caçadores e encarregados de desmancha até ao consumidor.

7. CONCLUSÕES

Com este trabalho não se esperava confirmar que existe transmissão de tuberculose entre animais domésticos e silváticos, mas sim apurar a possibilidade disso acontecer em “condições de campo” e, em caso afirmativo, determinar os factores de risco que mais poderiam contribuir para essa situação.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem confirmar a ocorrência de tuberculose causada por *M. bovis* em veados e javalis de vida livre, bem como a existência (frequente na área geográfica estudada) de zonas onde estas espécies coexistem com os animais domésticos (nomeadamente da espécie bovina em regime de produção extensivo). Assim, a transmissão da doença entre as diferentes espécies é uma hipótese real.

Durante o estágio realizado e através da pesquisa efectuada, foi também possível chegar às seguintes conclusões:

- A exploração da vertente cinegética das propriedades, ligada a actividades de lazer (caça) é uma actividade económica com importância crescente;
- As explorações que praticam as duas actividades (exploração cinegética de espécies de caça maior e produção de bovinos em regime extensivo) são de média/grande dimensão, tendo grandes áreas onde não existe separação entre o domínio silvático e as zonas forrageiras abertas aos bovinos;
- Os períodos de carência alimentar na natureza (secas), em que as espécies pecuárias são suplementadas com concentrados ou com cereais distribuídos em comedouros em locais não protegidos do acesso dos animais silváticos, potenciam os contactos entre as diferentes espécies;
- A possibilidade de as espécies silváticas acederem aos locais de alimentação e abeberamento de bovinos é significativa, criando mesmo hábitos de acesso;
- Constatou-se a ausência de cobertura total das jornadas de caça maior com acções de inspecção médico-veterinária, apesar de esta ter ocorrido na montaria descrita neste trabalho;
- A extinção dos focos de tuberculose bovina (como medida sanitária prevista no PE) é de facto implementada nos efectivos, mas sem uma concomitante intervenção a nível da fauna silvática, mesmo se confirmada uma relação epidemiológica (por impossibilidade prática ou falta de instrumentos para a executar);
- Há a possibilidade de a doença se instalar de forma importante na natureza a médio prazo, mesmo considerando o programa anual de acções de rastreio obrigatórias nos bovinos (levada a cabo em todos os efectivos) e o esforço colocado na vigilância e acompanhamento de focos.

Deste modo, é necessário desenvolver mais estudos sobre a doença nos animais silváticos, recorrendo a tecnologias de biologia molecular e a sistemas de informação geográfica, de maneira a avaliar o risco de doença e perceber melhor a epidemiologia da mesma. Mesmo havendo outros estudos que confirmem a transmissão da infecção entre bovinos domésticos e veados ou javalis, é necessário clarificar o sentido da mesma e esclarecer o papel das espécies silváticas como hospedeiros reservatório ou acidentais, para que de uma forma racional se possa gerir melhor a fauna silvática e os recursos cinegéticos.

Atendendo ao vasto território que espécies como o javali e o veado podem ocupar e ao facto de não existir uma monitorização regular da prevalência da infecção, o risco de transmissão às espécies domésticas e ao Homem existe e deverá ser melhor avaliado e controlado. Neste sentido, várias medidas podem ser implementadas como um maior confinamento dos bovinos presentes em áreas de risco (impedindo o contacto directo ou indirecto entre espécies) e a existência de planos de gestão de explorações cinegéticas que contemplem o controlo do tamanho das populações (através da não suplementação alimentar em alturas de carência ou mesmo da intensificação da caça).

Também o acompanhamento médico-veterinário dos procedimentos de desmancha e inspecção sanitária das espécies de caça maior se mostram fundamentais na protecção da saúde de todos os intervenientes, desde as pessoas que manipulam as carcaças destes animais até ao consumidor final.

A tuberculose bovina é, assim, um problema ainda existente no nosso país, devendo as autoridades competentes, os médicos veterinários, os produtores e os caçadores unir esforços na luta para a erradicação da doença, sem esquecer o risco de as espécies silváticas estarem envolvidas na sua transmissão.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abalos, P. & Retamal, P. (2004). Tuberculosis: una zoonosis re-emergente? *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 23(2), 583-594.
- Alexander, K.A., Laver, P.N., Michel, A.L., Williams, M., van Helden, P.D., Warren, R.M. & van Pittius, N.C. (2010). Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerging Infectious Diseases*, 16, DOI:10.3201/eid1608.100314.
- Allix-Béguec, C., Harmsen, D., Weniger, T., Supply, P. & Niemann, S. (2008). Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(8), 2692-2699.
- Almeida, V., Nunes, T., Vaz, Y., Melo, M., Fonseca, I.N. & Louzã, A. (2006). VI Encontro da Sociedade Portuguesa de Epidemiologia e Medicina Veterinária Preventiva: Agregados geográficos de tuberculose bovina na Direcção Regional de Agricultura do Alentejo. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 101(559-560), 319-341.
- Álvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Sáez, J.L., Marqués, S., Domínguez, C., Mínguez, O., Fernández-Mardomingo, B., Mateos, A., Domínguez, L. & Aranaz, A. (2009). Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. *Veterinary Microbiology*, 135, 389-393.
- Aranaz, A., Liébana, E., Mateos, A., Domínguez, L., Vidal, D., Domingo, M., Gonzolez, O., Rodriguez-Ferri, E.F., Bunschoten, A.E., van Embden & Cousins, D. (1996). Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (11), 2734-2740.
- Aranaz, A., Liébana, E., Gómez-Mampaso, E., Galán, J.C., Cousins, D., Ortega, A., Blazquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suarez, G. & Domínguez, L. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1263-1273.
- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A. & Domínguez, L. (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1785-1789.
- Aranaz, A., de Juan, L., Montero, N., Sánchez, C., Galka, M., Delso, C., Álvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Vela, A.I., Briones, V., Mateos, A. & Domínguez, L. (2004). Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (6), 2602-2608.
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (2010). A época da caça está a chegar. *ASAEnews nº 28*. Lisboa: ASAE.
- Autoridade Florestal Nacional & Direcção Geral de Veterinária (2010). *Guia de boas práticas higio-sanitárias: Caça maior*. Lisboa: AFN & DGV.
- Bengis, R.G., Kock, R.A. & Fischer, J. (2002). Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 21(1), 53-65.

- Biberstein, E.L. & Hirsh, D.C. (2004). *Mycobacterium*. In D.C. Hirsh, N.J. MacLachlan & R.L. Walker (Eds.), *Veterinary microbiology* (2nd ed.). (pp. 223-234). Iowa: Blackwell Science Ltd, Blackwell Publishing.
- Brosch, R., Pym, A.S., Gordon, S.V. & Cole, S.T. (2001). The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends in microbiology*, 9(9), 452-458.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., van Soolingen, D. & Cole, S.T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PNAS*, 99(6), 3684-3689.
- Cassidy, J.P. (2006). The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Veterinary Microbiology*, 112, 151-161.
- Centers for Disease Control and Prevention (2009). *Guide to the Application of Genotyping to Tuberculosis Prevention and Control*. Acedido em Set. 7, 2010, disponível em: <http://www.cdc.gov/tb/programs/genotyping/Chap3.htm>
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry III, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, M.A., Holroyd, N., Hornsby, S., Jagels, T., Krogh, K., McLean, A., Moule, J., Murphy, S., Oliver, L., Osborne, K., Quail, J., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S. & Barrell, B.G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393, 537-544.
- Corner, L.A. (2006). The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. *Veterinary Microbiology*, 112, 303-312.
- Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F., de Kantor, I. & Meslin, F.X. (1998). Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*, 4(1), 59-70.
- Cousins, D.V., Williams, S., Liébana, E., Aranaz, A., Bunschoten, A., van Embden, J. & Ellis, T. (1998). Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1), 168-178.
- Cousins, D.V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., Duignan, P., Murray, A., Dupont, C., Ahmed, N., Collins, D.M., Butler, W.R., Dawson, D., Rodríguez, D., Loureiro, J., Romano, M.I., Alito, A., Zumarraga, M. & Bernardelli, A. (2003). Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1304-1314.
- Cousins, D.V. & Florisson, N. (2005). A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 24 (3), 1039-1059.
- Decisão 2003/467/CE da Comissão de 23 de Junho de 2003. *Jornal Oficial da União Europeia nº L 156/74*. Comissão das Comunidades Europeias. Bruxelas.
- Decisão 2010/695/UE da Comissão de 17 de Novembro de 2010. *Jornal Oficial da União Europeia nº L 303/14*. Comissão Europeia. Bruxelas.

- Decreto-Lei n.º 157/98 de 9 de Junho. *Diário da República* nº 133 - I Série - A. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- Decreto-Lei n.º 272/2000 de 8 de Novembro. *Diário da República* nº 258 - I Série - A. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- Decreto-Lei n.º 202/2004 de 18 de Agosto. *Diário da República* nº 194 - I Série - A. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- de Kantor, I.N. & Ritacco, V. (2006). An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Veterinary Microbiology*, 112, 111-118.
- de Lisle, G.W., Bengis, R.G., Schmitt, S.M. & O'Brien, D.J. (2002). Tuberculosis in free-wildlife: detection, diagnosis and management. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 21(2), pp. 317-324.
- de Mendoza, J.H., Parra, A., Tato, A., Alonso, J.M., Rey, J.M., Peña, J., García-Sánchez, A., Larrasa, J., Teixidó, J., Manzano, G., Cerrato, R., Pereira, G., Fernández-Llario, P. & de Mendoza, M.H. (2006). Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992–2004). *Preventive Veterinary Medicine*, 74, 239–247.
- DeRiemer, K. & Daley, C.L. (2004). The molecular epidemiology of tuberculosis. In M.M. Madkour (Ed.), *Tuberculosis* (pp. 57-74). Berlin: Springer.
- Direcção Geral de Veterinária (2008). *Programa de Erradicação da Tuberculose Bovina 2009: Portugal*. Lisboa: DGV.
- Direcção Geral de Veterinária (2010). *Relatórios técnicos anuais de 2009 sobre os programas de erradicação*. Lisboa: DGV.
- Directiva 64/432/CEE do Conselho de 26 de Junho de 1964. *Jornal Oficial* nº 121. Conselho da Comunidade Económica Europeia. Bruxelas.
- Directorate-General for Health and Consumers (2009). *2008 Annual report on notifiable diseases of bovine animals and swine (within the framework of Article 8 of Council Directive 64/432/EEC)*. DG SANCO.
- Directorate-General for Health and Consumers (2010). *Report of the "Bovine Tuberculosis" Sub-Group Task Force meeting held in Idanha-a-Nova, Portugal*. DG SANCO.
- Duarte, E.L., Domingos, M., Amado, A., Cunha, M.V. & Botelho, A. (2010). MIRU-VNTR typing adds discriminatory value to groups of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* strains defined by spoligotyping. *Veterinary Microbiology*, 143, 209-306.
- Duarte, E.M.L. (2008). *Tuberculose bovina: detecção e genotipagem de Mycobacterium bovis*. Tese de Doutoramento. Évora: Universidade de Évora.
- European Food Safety Authority (2008). *Portugal. Trends and sources of zoonosis and zoonotic agents in humans, foodstuffs, animals and feedingstuffs in 2008*. EFSA.
- European Food Safety Authority (2010). *The Community summary report on Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008*. EFSA.

- Fabre, M., Hauck, Y., Soler, C., Koeck, J., van Ingen, J., van Soolingen, D., Vergnaud, G. & Pourcel, C. (2010). Molecular characteristics of “*Mycobacterium canettii*” the smooth *Mycobacterium tuberculosis* bacilli. *Infection, Genetics and Evolution*, DOI:10.1016/j.meegid.2010.07.016.
- Fakinham, J. (1996). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 177-215.
- Fonseca, A.P. (2010). Programa de erradicação da tuberculose bovina: dados e pontos críticos. In “*Bovine Tuberculosis*” Sub-Group Task Force meeting held in Idanha-a-Nova, Portugal. DG SANCO.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P.R., Parkhill, J., Barrell, B.G., Cole, S.T., Gordon, S.V. & Hewinson, R.G. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *PNAS*, 100(13), 7877-7882.
- Gilbert, M., Mitchell, A., Bourn, D., Mawdsley, J., Clifton-Hadley, R. & Wint, W. (2005). Cattle movements and bovine tuberculosis in Great Britain. *Nature*, 435, 491-496.
- Goh, K.S., Fabre, M., Huard, R.C., Schmid, S., Sola, C. & Rastogi, N. (2006). Study of the gyrB gene polymorphism as a tool to differentiate among *Mycobacterium tuberculosis* complex subspecies further underlines the older evolutionary age of ‘*Mycobacterium canettii*’. *Molecular and Cellular Probes*, 20, 182-190.
- Goodchild, A.V. & Clifton-Hadley, R.S. (2001). Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*, 81(1/2), 23-41.
- Goodfellow, M. & Magee, J.G. (1998). Taxonomy of mycobacteria. In P.R. Gangadharam & P.A. Jenkins (Edits.), *Mycobacteria I - Basic aspects* (pp. 1-71). New York: Chapman & Hall Medical Microbiology Series.
- Gordejo, F.J. & Vermeersch, J.P. (2006). Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Veterinary Medicine*, 112, 101–109.
- Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T., McGill, K. & Collins, J.D. (2006). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Veterinary Microbiology*, 112, 171-179.
- Gowtage-Sequeira, S., Paterson, A., Lyashchenko, K.P., Lesellier, S. & Chambers, M.A. (2009). Evaluation of the CervidTB STAT-PAK for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in wild deer in Great Britain. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(10), 1449–1452.
- Gutierrez, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omais, B., Marmiesse, M., Supply, P. & Vincent, V. (2005). Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens*, 1(1), 55-61.
- Hewinson, G. (2001). Introduction to *M. bovis* issue. *Tuberculosis*, 81(1), 3.
- Hlavsa, M.C., Moonan, P.K., Cowan, L.S., Navin, T.R., Kammerer, J.S., Morlock, G.P., Crawford, J.T. & LoBue, P.A. (2008). Human Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *Clinical Infectious Diseases*, 47, 168-175.

- Huard, R.C., Fabre, M., de Hass, P., Lazzarini, L.C., van Soolingen, D., Cousins, D. & Ho, J.L. (2006). Novel Genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Bacteriology*, 188(12), 4271-4287.
- Humblet, M., Boschirolì, M.L. & Saegerman, C. (2009). Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Vet. Res.*, 40:50, DOI:10.1051/vetres/2009033.
- Independent Scientific Group on Cattle TB (2007). Bovine TB: the scientific evidence, a science base for a sustainable policy to control TB in cattle, an epidemiological investigation into bovine tuberculosis. Final report of the Independent Scientific Group on Cattle TB. London: ISG.
- Instituto Superior Técnico (2009). *Genotipagem de bactérias*. Acedido em Set. 10, 2010, disponível em: <http://www.e-escola.pt/ftema.asp?canal=biologia&id=161>.
- Johnson, L.K., Liébana, E., Nunez, A., Spencer, Y., Clifton-Hadley, R., Jahans, K., Ward, A., Barlow, A. & Delahay, R. (2008). Histological observations of bovine tuberculosis in lung and lymph node tissues from British deer. *The Veterinary Journal*, 175, 409–412.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M. & van Embden, J. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4), 907-914.
- Katoch, V.M. (2004). Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian Journal of Medical Research*, 120, 290-304.
- Kazda, J., Pavlik, I., Falkinham, J.O. & Hruska, K. (Edits.). (2009). *The ecology of mycobacteria: impact on animal's and human's health*. Springer.
- Liébana, E., Johnson, L., Gough, J., Durr, P., Jahans, K., Clifton-Hadley, R., Spencer, Y., Hewinson, R.G. & Downs, S.H. (2008). Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. *The Veterinary Journal*, 176, 354-360.
- Llamazares, O.R., Martín, C.B., Nistal, D.A., Redondo, V.A., Rodríguez, L.D. & Ferri, E.F. (1999). Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gama assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. *Veterinary Microbiology*, 70, 55-66.
- Mahairas, G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C. & Stover, K. (1996). Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *Journal of Bacteriology*, 178(5), 1274-1282.
- Martín-Hernando, M.P., Hofle, U., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Barral, M., Garrido, J.M., de la Fuente, J. & Gortazar, C. (2007). Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis*, 87, 360-367.
- Matos, A.F.R. (2009). *Tipificação molecular de estirpes de Mycobacterium bovis isoladas de animais silváticos e domésticos*. Tese de Mestrado em Microbiologia Médica. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa.
- Matos, F., Amado, A. & Botelho, A. (2010). Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated in the first outbreak of bovine tuberculosis in the Azores Islands: a case report. *Veterinarni Medicina*, 55(3), 133-136.

- Menzies, F.D. & Neill, S.D. (2000). Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *The Veterinary Journal*, 160, 92–106.
- Michel, A.L., Muller, B. & van Helden, P.D. (2009). *Mycobacterium bovis* at the animal–human interface: A problem, or not? *Veterinary Microbiology*, DOI:10.1016/j.vetmic.2009.08.029.
- Milian-Suazo, F., Harris, B., Díaz, C.A., Torres, C.R., Stuber, T., Ojeda, G.A., Loredó, A.M., Soria, M.P. & Payeur, J.B. (2008). Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: usefulness in international trade. *Preventive Veterinary Medicine*, 87, 261–271.
- Mostowy, S., Inwald, J., Gordon, S., Martin, C., Warren, R., Kremer, K., Cousins, D. & Behr, M.A. (2005). Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6386–6395.
- Naranjo, V., Gortazar, C., Vicente, J. & de la Fuente, J. (2008). Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Veterinary Microbiology*, 127, 1–9.
- National Center for Biotechnology Information (2010). *Taxonomy Browser*. Acedido em Set. 1, 2010, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>
- Neill, S.D., Bryson, D.G. & Pollock, J.M. (2001). Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis*, 81(1/2), 79–86.
- Niemann, S., Richter, E. & Rusch-Gerdes, S. (2002). Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (Approved Lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 433–436.
- Olson, I., Barletta, R.G. & Thoen, C.O. (2010). *Mycobacterium*. In C.L. Gyles, J.F. Prescott, G. Songer & C.O. Thoen (Edits.), *Pathogenesis of bacterial infections in animals* (4th ed.). (pp. 113–132). Iowa: Wiley-Blackwell.
- Palmer, M.V. & Waters, W.R. (2006). Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Veterinary Microbiology*, 112, 181–190.
- Parra, A., Larrasa, J., García, A., Alonso, J.M. & de Mendoza, J.H. (2005). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: A first approach to risk factor analysis. *Veterinary Microbiology*, 110, 293–300.
- Peleteiro, M.C. (2009). Formas anatomopatológicas da tuberculose bovina. In *Apontamentos teóricos de Patologia e Clínica das Doenças Infecciosas, Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa*. AEFMV.
- Pfeiffer, P.U. (1994). *The role of a wildlife reservoir in the epidemiology of bovine tuberculosis*. Ph.D. Thesis. New Zealand: Masey University.
- Plana, M.A. (2004). *Bases para la inspección de la tuberculosis bovina en matadero*. Gobierno de Chile. Servicio Agrícola y Ganadero.
- Pollock, J.M., Rodgers, J.D., Welsh, M.D. & McNair, D. (2006). Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. *Veterinary Microbiology*, 112, 141–150.

- Pollock, J.M., Welsh, M.D. & McNair, J. (2005). Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108, 37-43.
- Pym, A.S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M. & Cole, S.T. (2002). Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Molecular Microbiology*, 46(3), 709-717.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. & Carter, G.R. (2004). *Mycobacterium* species. In *Clinical veterinary microbiology* (pp. 156-169). Mosby, Elsevier Limited.
- Radostitis, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. & Constable, P.D. (2007). Diseases associated with *Mycobacterium* spp. In *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. (10th ed.). (pp. 1007-1044). Saunders Ltd.
- Rastogi, N., Legrand, E. & Sola, C. (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech*, 20(1), 21-25.
- Regassa, A., Medhin, G. & Ameni, G. (2008). Bovine tuberculosis is more prevalent in cattle owned by farmers with active tuberculosis in central Ethiopia. *The Veterinary Journal*, 178, 119-125.
- Regulamento (CE) 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004. *Jornal Oficial da União Europeia* nº L 139. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Estrasburgo.
- Rodríguez, S., Romero, B., Bezos, J., de Juan, L., Álvarez, J., Castellanos, E., Moya, N., Lozano, F., González, S., Sáez-Llorente, J.L., Mateos, A., Domínguez, L. & Aranaz, A. (2010). High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Veterinary Microbiology*, 141, 89-95.
- Rogall, T., Wolters, J., Flohr, T. & Bottger, E.C. (1990). Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(4), 323-330.
- Rohonczy, E., Balachandran, A., Dukes, T., Payeur, J., Rhyhan, J., Saari, D., Whiting, T., Wilson, S. & Jarnagin, J. (1996). A comparison of gross pathology, histopathology, and mycobacterial culture for the diagnosis of tuberculosis in elk (*Cervus elaphus*). *Can. Vet. J.*, 60, 108-114.
- Romero, B., de Juan, L., Aranaz, A., Álvarez, J., Bezos, J., Mateos, A., Gómez-Mampaso, E. & Domínguez, L. (2006). Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3405-3408.
- Rothschild, B.M., Martin, L.D., Lev, G., Bercovier, H., Bar-Gal, G. K., Greenblatt, C., Donoghue, H., Spigelman, M. & Brittain, D. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clinical Infectious Diseases*, 33, 305-311.
- Rua-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H. & Clifton-Hadley, R.S. (2006). Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*, 81, 190-210.

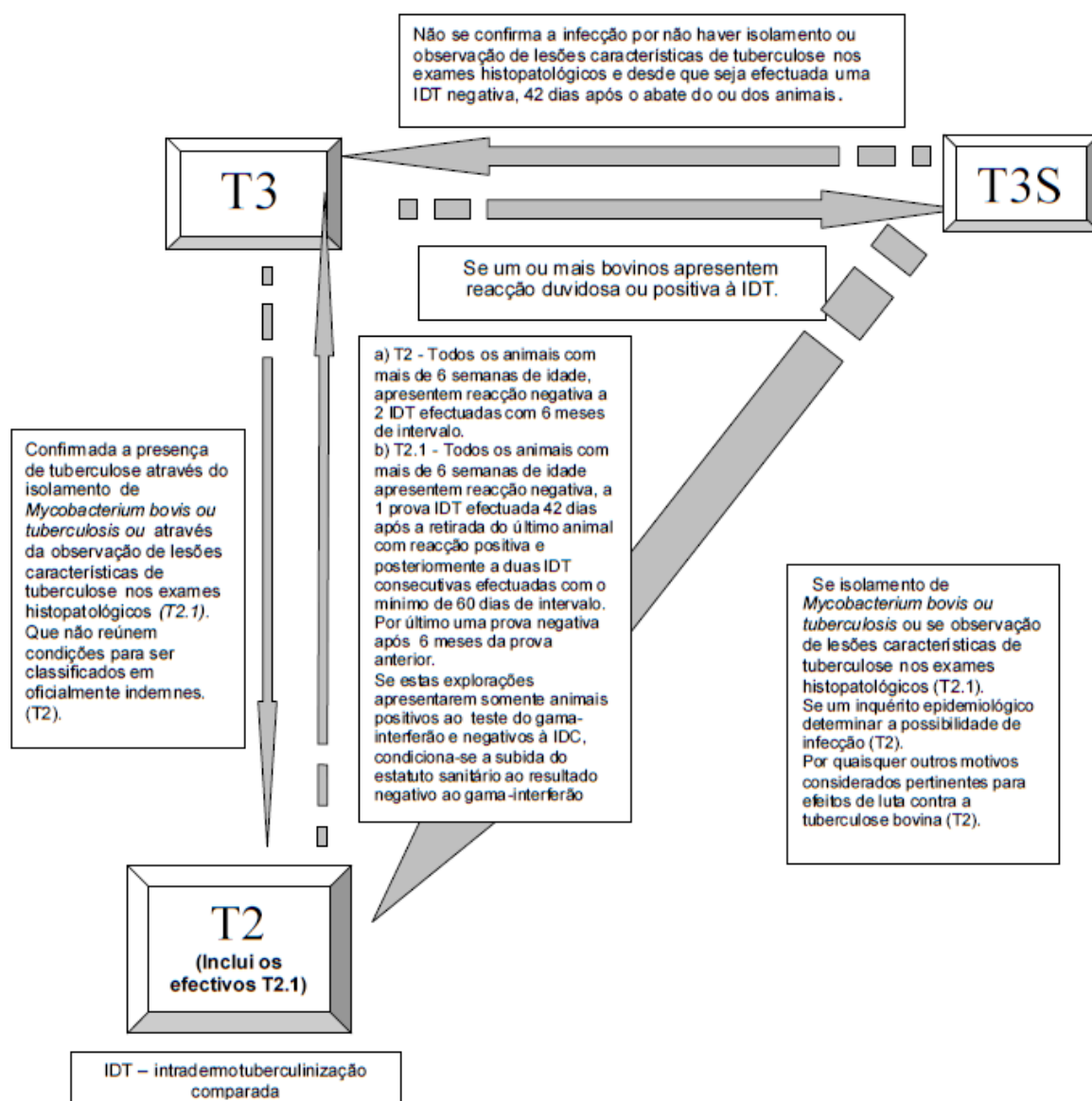
- Santos, N., Hélder, S. & Tavares, E. (2005). IV Encontro da Sociedade Portuguesa de Epidemiologia e Medicina Veterinária Preventiva: Epidemiovigilância das espécies cinegéticas no Alto Minho – implementação de uma rede e resultados preliminares. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 100(553-554, supl.129-130), 1-17.
- Santos, N.G.C.C. (2007). *A tuberculose no javali em Portugal. Tese de Mestrado*. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Santos N., Geraldes M., Afonso A., Almeida V. & Correia-Neves, M. (2010). Diagnosis of tuberculosis in the wild boar (*Sus scrofa*): A comparison of methods applicable to hunter-harvested animals. *PLoS ONE*, 5(9), DOI:10.1371/journal.pone.0012663.
- Shinnick, T.M. & Good, R.C. (1994). Mycobacterial taxonomy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 13(11), 884-901.
- Skoric, M., Shitaye, E.J., Halouzka, R., Fictum, P., Trcka, I., Heroldova, M., Tkadlec, E. & Pavlik, I. (2007). Tuberculous and tuberculoid lesions in free living small terrestrial mammals and the risk of infection to humans and animals: a review. *Veterinarni Medicina*, 52(4), 144-161.
- Skuce, R.A. & Neill, S.D. (2001). Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: exploiting molecular data. *Tuberculosis*, 81(1/2), 169-175.
- Skuce, R.A., McCorry, T.P., McCarroll, J.F., Roring, S.M., Scott, A.N., Brittain, D., Hughes, S.L., Hewinson, R.G. & Neill, S.D. (2002). Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology*, 148, 519-528.
- Smith, N.H., Kremer, K., Inwald, J., Dale, J., Driscoll, J.R., Gordon, S.V., van Soolingen, D., Hewinson, R.G. & Smith, J.M. (2006). Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Theoretical Biology*, 239, 220-225.
- Smith, N.H., Hewinson, R.G., Kremer, K., Brosch, R. & Gordon, S.V. (2009). Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 537-544.
- Smith, N. & Hilscher, R. (n.d.). *M.bovis.org*. Acedido em Set. 11, 2010, disponível em: <http://www.mbovis.org/spoligodatabase/intro.htm>
- Sola, C., Filliol, I., Legrand, E., Makrousov, I. & Rastogi, N. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR, and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. *Journal of Molecular Evolution*, 53, 680-689.
- Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., van Soolingen, D. & Locht, C. (2001). Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), 3563-3571.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rusch-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E., de Haas, P., van Deutekom, H., Roring, S., Bifani, P., Kurepina, N., Kreiswirth, B., Sola, C., Rastogi, N., Vatin, V., Gutierrez, M.C., Fauville, M., Niemann, S., Skuce, R., Kremer, K., Locht, C. & van Soolingen, D. (2006). Proposal for standardization of optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Tandem Repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 4498-4510.

- Taylor, G.M., Murphy, E., Hopkins, R., Rutland, P. & Chistov, Y. (2007). First report of *Mycobacterium bovis* DNA in human remains from the Iron Age. *Microbiology*, 153, 1243-1249.
- Thoen, C., LoBue, P. & Kantor, I. (2006). The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Veterinary Microbiology*, 112, 339–345.
- Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W. & Barlough, J.E. (1988). The genus *Mycobacterium*. In *Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals* (8th ed.). (pp. 270-289). New York: Cornell University Press.
- van Soolingen, D. (2001). Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *Journal of Internal Medicine*, 249, 1-26.
- Vilhena, M.J.C. (2010). *Identificação das zonas de risco para a tuberculose zoonótica em Portugal. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública*. Porto: Faculdade de Medicina - Universidade do Porto.
- Waters, W.R., Palmer, M.V., Thacker, T.C., Orloski, K., Nol, P., Harrington, N.P., Olsen, S.C. & Nonnecke, B.J. (2008). Blood culture and stimulation conditions for the diagnosis of tuberculosis in cervids by the Cervigam assay. *Veterinary record*, 162, 203-208.
- Welsh, M.D., Cunningham, R.T., Corbett, D.M., Girvin, R. M., McNair, J., Skuce, R.A., Bryson, D.G. & Pollock, J.M. (2005). Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology*, 114, 101-111.
- Whipple, D.L. & Palmer, M.V. (2000). Reemergence of tuberculosis in animals in the United States. In C. Brown & C. Bolin (Edits.), *Emerging diseases of animals* (pp. 281-300). Washington, D.C.: ASM Press.
- Wilsmore, T. & Taylor, N. (2008). *Bovine Tuberculosis: an update*. The University of Reading, Veterinary Epidemiology and Economics Research Unit.
- World Health Organization (2009). *Global tuberculosis control: A short update to the 2009 report*. WHO
- World Organisation for Animal Health (2009). *OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2010: Bovine tuberculosis*. OIE
- World Organization for Animal Health (2010). *World animal health information database: Bovine Tuberculosis*. Acedido em Set. 15, 2010, disponível em: <http://www.oie.int/wahis/public.php?page=home>
- Zumárraga, M.J., Martin, C., Samper, S., Alito, A., Latini, O., Bigi, F., Roxo, E., Cicuta, M.E., Errico, F., Ramos, M.C., Cataldi, A., van Soolingen, D. & Romano, M.I. (1999). Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*-related infections in South America. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(2), 296-303.

ANEXOS

ANEXO 1

Condições para a subida e descida de estatuto sanitário de um efectivo, de acordo com o Programa de Erradicação da Tuberculose Bovina. Adaptado de DGV, 2009.



ANEXO 2

Inquérito epidemiológico realizado em situações de ocorrência de animais positivos à IDTC ou de surpresa de matadouro em abates de rotina.

TUBERCULOSE BOVINA - INQUÉRITO – PARTE I **Explorações Bovinas com Animais Suspeitos / Focos de Tuberculose**

Objectivo: Caracterização da exploração, avaliação da origem da infecção e avaliação da sua possível difusão para outras explorações.

1- Caracterização da Exploração e Assistência Veterinária

1.1. Marca oficial de exploração (MOE) _____

Detentor: _____ Telefone/Telemóvel: _____

Local _____

Localidade/Freguesia _____ Concelho: _____

OPP _____ Não aderente a OPP ☐

Geo-referenciação (facultativa): Latitude _____ Longitude _____

1.2. Efectivo da exploração (c/base no SNIRA/RED):

Fêmeas Adultos _____ Fêmeas de substituição _____ Machos reprodutores _____ Engorda _____

Caprinos ☐ nº _____ Veados ☐ nº _____ Outras espécie(s) _____

1.3. Assistência veterinária - médico veterinário executor:

Nome _____

Cédula Profissional nº _____ Contacto telefónico _____

2 - Classificação Sanitária: T _____ (Anexo 1 - listagem do PISA)

3- Origem e Difusão da Infecção (*dados dos últimos 12 meses)

3.1. Contactos directos com ruminantes de outras explorações (explorações de contacto)* ☐

Caracterização das explorações: Bovinos ☐ Datas(s) _____

MOE(s): _____ Classificação(ões) sanitária(s): _____

Tempo de contacto: acidental ☐ pouco frequente ☐ frequente ☐

vedações ☐ transumância ☐ pastos comuns ☐ caminhos partilhados ☐

3.2. Contacto com explorações de ruminantes do mesmo proprietário ☐

MOE(s) _____ (Anexo 2 - listagem do PISA/SNIRA)

3.3. Contactos directos com outros animais ☐

Caprinos ☐ MOE(s): _____ Veados ☐ Javalis ☐ Outras espécies silváticas _____

Obs: _____

3.4. Introdução de bovinos * ☐ (Anexo 3 listagem SNIRA)

Explorações ☐ MOE(s) _____ Comerciantes ☐ MOE(s) _____ Feiras

☐ /mercados ☐ /leilões ☐ /CA ☐ MOE(s) _____ Empréstimo ☐ MOE(s) _____

3.5. Identificação do transportador habitual _____

3.6. Testes de pré-movimentação de animais introduzidos * ☐ (**Anexo 4** – resultados)
 Data(s) do(s) rastreio(s) _____ Resultado(s) _____

3.7. Partilha de equipamentos/alaias/veículos com outras explorações * ☐
 MOE(s) _____ Classificação(ões) sanitária(s) T _____

3.8. Casos de tuberculose nos últimos 5 anos ☐ (Se sim, **Anexo 5** – listagem do PISA)
 Obs: _____

3.9. Saída de animais da exploração * ☐ (Se sim, **Anexo 6** – listagem do PISA)
 Caracterização da(s) exploração(ões) de destino: Bovinos ☐ Caprinos ☐
 MOE(s): _____ Classificação(ões) sanitária(s): _____
 Feiras ☐ mercados ☐ leilões ☐ CA ☐ MOE(s) _____ Comerciantes ☐ MOE(s) _____

3.10. Fonte de água ☐
 Origem e local de abeberamento _____

3.11. Efluentes ☐
 Entrada/saída/espalhamento _____

3.12. Esquema das explorações confinantes geograficamente, MOE e classificações sanitárias (prioritariamente utilização de SIGs) – Anexar Folha

3.13. Opiniões do proprietário sobre a origem provável da doença
 Transumância /mistura de animais/pastagens comuns ☐ Introdução de animais ☐ Vizinhança
☐ Re-ocorrência ☐ Animais silváticos ☐ Outras causas ☐ _____

3.14. Opiniões do veterinário executor sobre a origem provável da doença
 Transumância /mistura de animais/pastagens comuns ☐ Introdução de animais ☐ Vizinhança
☐ Re-ocorrência ☐ Animais silváticos ☐ Outras causas ☐ _____

3.15. Avaliação epidemiológica do relator quanto à provável origem da infecção:

3.16. Observações: _____

.....

Data ____/____/____

Relator _____

Informações prestadas pelo detentor da exploração ☐

Se não, identificar função/ grau parentesco _____

CARIMBO

TUBERCULOSE BOVINA - INQUÉRITO – PARTE II
Explorações Bovinas com Animais Suspeitos / Focos de Tuberculose

Objectivo: Informações que permitem avaliar a difusão da doença na exploração e programar estratégias de controlo para redução da sua difusão na própria exploração e para outras.

1. Caracterização da Exploração e do Sistema Produtivo

1.1. Aptidão Produtiva

Leite ☐ Carne ☐ Outra ☐ _____

Intensivo ☐ semi-intensivo ☐ extensivo ☐ Obs: _____

1.2. Regime da exploração

Estabulação ☐ Pastoreio ☐ Misto ☐ % Pastoreio _____ Obs: _____

Animais por hectare _____

1.3. Prática transumância/pastoreio comum ☐ Caracterize _____

1.4. Finalidade produtiva dos animais adquiridos

Reprodução ☐ Produção leite/carne ☐ Engorda ☐ Outras ☐ _____

1.5. Reposição do efectivo reprodutor (fêmeas):

Auto-reposição ☐ Compra no exterior ☐ Gestantes ☐

1.6. Avaliação dos possíveis pontos de contacto com animais de outras explorações

(em todo o perímetro da exploração): _____

1.7. Biossegurança das vedações: classificação ☐ (1=excelente a 4=inexistente)

Outras explorações ☐ Hospedeiros silváticos ☐ Obs: _____

1.8. Condições para isolamento dos animais: classif. ☐ (1=excelente a 4=inexistente)

1.9. Maneio em grupos produtivos ☐ Etários ☐ Obs: _____

1.10. Higiene da exploração: Limpeza e desinfecção ☐ Periodicidade _____

Apreciação das condições de higiene da exploração: Boas ☐ Suficientes ☐ Más ☐

1.11. Zoonose: Tuberculose humana ☐ Venda/processamento de produtos ☐ _____

1.12. Recomendações de medidas de controlo:

TUBERCULOSE BOVINA - INQUÉRITO – PARTE III

Explorações Bovinas com Animais Suspeitos / Focos de Tuberculose

1.Explorações Epidemiologicamente Ligadas

1.1.Dados das explorações / Número de animais / Classificação sanitária

MOE _____

MOE _____
MOE _____

MOE _____

1.2.Caracterização das explorações

MOE _____

MOE _____
MOE _____

MOE _____

1.4.Resultados (rastreio/gama interferção/isolamento/caracterização laboratorial)

MOE _____

MOE _____
MOE _____

MOE _____

1.5.Observações

This image shows a single sheet of white paper with horizontal blue ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

ANEXO 3

Folha de requisição para análises (modelo 518) de amostras de javalis no âmbito da rede de epidemiovigilância da fauna silvática.

FOLHA DE REQUISIÇÃO PARA ANÁLISES <small>(Este impresso deverá acompanhar qualquer tipo de material para análise)</small> <small>(Consultar as condições de prestação de serviço no verso)</small>											
<p>JAVALIS PARA O PLANO DE VIGILÂNCIA DAS PESTES SUÍNAS CLÁSSICA E AFRICANA E DA TRIQUINELOSE</p> <p style="text-align: center;">(Por Montaria)</p> <p style="text-align: center;">⇒ PREENCHER COM LETRA LEGÍVEL</p>	<p style="text-align: right;"><small>(A preencher pelo LNTV)</small></p> <p>Nº ANÁLISE: _____</p> <p>DATA E HORA DE ENTREGA: _____</p> <p style="text-align: right; margin-top: 20px;">Recebido por _____</p>										
<p>Identificação do Material (se necessário utilizar tabela anexa para descrição das amostras) (Preenchimento obrigatório)</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: none;">Nº de Requisição Oficial / Externo : _____</td> <td style="border: none;">Nº total de Amostras : _____</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Data da colheita: _____</td> <td style="border: none;">Data de envio ao laboratório: _____ Data do Abate/Caçada : _____</td> </tr> </table>		Nº de Requisição Oficial / Externo : _____	Nº total de Amostras : _____	Data da colheita: _____	Data de envio ao laboratório: _____ Data do Abate/Caçada : _____						
Nº de Requisição Oficial / Externo : _____	Nº total de Amostras : _____										
Data da colheita: _____	Data de envio ao laboratório: _____ Data do Abate/Caçada : _____										
<p>Montaria/Proprietário (Preenchimento completo obrigatório)</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr><td style="border: none;">Nome : _____</td></tr> <tr><td style="border: none;">Morada : _____</td></tr> <tr><td style="border: none;">Cod. Postal : _____ Localidade : _____ Concelho: _____</td></tr> <tr><td style="border: none;">Telefone : _____ Telemóvel : _____ Fax : _____ Email : _____</td></tr> </table>		Nome : _____	Morada : _____	Cod. Postal : _____ Localidade : _____ Concelho: _____	Telefone : _____ Telemóvel : _____ Fax : _____ Email : _____						
Nome : _____											
Morada : _____											
Cod. Postal : _____ Localidade : _____ Concelho: _____											
Telefone : _____ Telemóvel : _____ Fax : _____ Email : _____											
<p>Médico Veterinário Responsável / Entidade Oficial (Preenchimento completo obrigatório)</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr><td style="border: none;">Dir. Reg. Agríc. : _____ D.I.V. de: _____</td></tr> <tr><td style="border: none;">Nome : _____</td></tr> <tr><td style="border: none;">Morada : _____</td></tr> <tr><td style="border: none;">Codigo Postal : _____ Localidade : _____</td></tr> <tr><td style="border: none;">Telefone : _____ Telemóvel : _____ Fax : _____ Email : _____</td></tr> </table>		Dir. Reg. Agríc. : _____ D.I.V. de: _____	Nome : _____	Morada : _____	Codigo Postal : _____ Localidade : _____	Telefone : _____ Telemóvel : _____ Fax : _____ Email : _____					
Dir. Reg. Agríc. : _____ D.I.V. de: _____											
Nome : _____											
Morada : _____											
Codigo Postal : _____ Localidade : _____											
Telefone : _____ Telemóvel : _____ Fax : _____ Email : _____											
<p>Factura em nome de : (Preenchimento completo obrigatório)</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr><td colspan="2" style="border: none;">Nome : Direcção Geral de Veterinária - Largo da Academia Nacional das Belas Artes, 2</td></tr> <tr><td colspan="2" style="border: none;">Morada : _____</td></tr> <tr><td style="border: none;">Codigo Postal : 1249-105</td><td style="border: none;">Localidade : Lisboa</td></tr> <tr><td style="border: none;">Telefone : _____</td><td style="border: none;">Nº Contribuinte : _____</td></tr> <tr><td style="border: none;">Telemóvel : _____</td><td style="border: none;">Fax : _____ Email : _____</td></tr> </table>		Nome : Direcção Geral de Veterinária - Largo da Academia Nacional das Belas Artes, 2		Morada : _____		Codigo Postal : 1249-105	Localidade : Lisboa	Telefone : _____	Nº Contribuinte : _____	Telemóvel : _____	Fax : _____ Email : _____
Nome : Direcção Geral de Veterinária - Largo da Academia Nacional das Belas Artes, 2											
Morada : _____											
Codigo Postal : 1249-105	Localidade : Lisboa										
Telefone : _____	Nº Contribuinte : _____										
Telemóvel : _____	Fax : _____ Email : _____										
<p>Motivo da Análise:</p> <p>Plano de Vigilância <input type="checkbox"/> Outro <input type="checkbox"/> especifique _____</p>											
<p>Exames pretendidos: (Preenchimento obrigatório)</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: none; vertical-align: top;"> Viroológico : pesquisa vírus <input type="checkbox"/> pesquisa de anticorpos <input type="checkbox"/> titulação de anticorpos <input type="checkbox"/> </td> <td style="border: none; vertical-align: top;"> Parasitológico <input type="checkbox"/> Pesquisa de Trichinella (Método de digestão artificial, conforme Portarias nº 241/90 e 541/93) <input type="checkbox"/> </td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="border: none;"> OUTROS <input type="checkbox"/> Especifique : _____ </td> </tr> </table>		Viroológico : pesquisa vírus <input type="checkbox"/> pesquisa de anticorpos <input type="checkbox"/> titulação de anticorpos <input type="checkbox"/>	Parasitológico <input type="checkbox"/> Pesquisa de Trichinella (Método de digestão artificial, conforme Portarias nº 241/90 e 541/93) <input type="checkbox"/>	OUTROS <input type="checkbox"/> Especifique : _____							
Viroológico : pesquisa vírus <input type="checkbox"/> pesquisa de anticorpos <input type="checkbox"/> titulação de anticorpos <input type="checkbox"/>	Parasitológico <input type="checkbox"/> Pesquisa de Trichinella (Método de digestão artificial, conforme Portarias nº 241/90 e 541/93) <input type="checkbox"/>										
OUTROS <input type="checkbox"/> Especifique : _____											

[illegible]

* (1) Sg - Sangue; Bq - Bazo; Am - Amígdalas; (2) Ms - Masséter; Lg - Língua; Di - Diafragma; Ab - Antebraço; (3) Especificar

Nota: A ref^a da amostra deve corresponder ao conjunto do material colhido proveniente do mesmo animal.

Observações

--

Condições gerais de prestação de serviços analíticos

1. A colheita e envio de amostras é da responsabilidade do Cliente.
2. O LNTV reserva o direito de rejeição das amostras para análise, em caso de insuficiência de quantidade, falta de integridade e/ou falta de requisitos de conservação (temperatura) ou entregas fora do horário de funcionamento.
3. Os exames pretendidos só serão iniciados depois do LNTV estar de posse dos elementos informativos constantes desta folha de informação.
4. Os resultados são apresentados em boletins de análise.
5. Os boletins de análise são emitidos e enviados com a respectiva factura por correio normal para a morada indicada pelo cliente, salvo nas condições consideradas especiais e expressamente indicadas por escrito no acto da entrega das amostras, sendo neste caso possível o seu envio por outra via expedita.
6. Todos os dados das amostras são considerados confidenciais.
7. Serão comunicados à autoridade sanitária nacional, as doenças de declaração obrigatória, detecção de substâncias proibidas ou quando se detectem valores superiores aos limites máximos estabelecidos para contaminantes ou situações que indiquem ou indiciem prejuízo para a saúde pública.
8. A lista de ensaios e respectivos preços e alterações serão sempre publicados no Diário da República.
9. Os dados pessoais fornecidos destinam-se exclusivamente para os fins expressos na presente recatificação.

☐ Aceito Rúbrica:

Data : de de

O Médico Veterinário Responsável
(Preenchimento obrigatório)

Nº Cart. Profissional : _____
(Preenchimento obrigatório)

NOTA IMPORTANTE:

Estes impressos estão disponíveis na Recepção de amostras do Departamento de PATOLOGIA deste Laboratório e na página Web : www.min-agricultura.pt -
Tabela de Preços - Laboratório Nacional de Investigação Veterinária -
Modelos de Recuperação de Análises.

Colabore no seu preenchimento, dado que facilitará a orientação das pesquisas a efectuar, no sentido de se promover uma resposta mais rápida e objectiva. **Agradecemos a colaboração dispensada.**